



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**  
**PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA**

**PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *LEISHMANIA* SPP. E INGESTA  
SANGUÍNEA EN ESPECIES DE *LUTZOMYIA* VECTORES DE  
LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA EN LA COMUNIDAD DE TRINIDAD DE  
LAS MINAS, DISTRITO DE CAPIRA, PANAMÁ.**

**POR**  
**CHYSTRIE ANITH RIGG CARREÑO**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2016**

21

10 OCT 2016

V. Balboa

**PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *LEISHMANIA* SPP. E INGESTA  
SANGUÍNEA EN ESPECIES DE *LUTZOMYIA* VECTORES DE  
LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA EN LA COMUNIDAD DE TRINIDAD DE  
LAS MINAS, DISTRITO DE CAPIRA, PANAMÁ.**

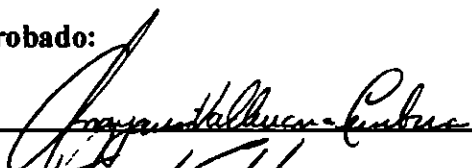
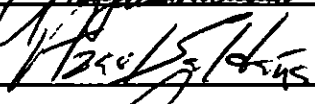
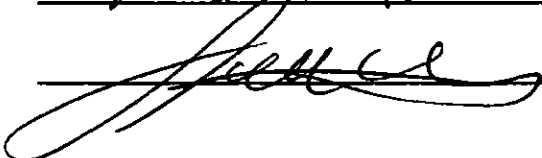
**TESIS**

**Presentada como uno de los requisitos para optar al Título de Maestro en Ciencias  
con Especialización en Entomología Médica.**

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**Permiso para su publicación total o parcial debe ser obtenido en la Vicerrectoría de  
Investigación y Postgrado.**

**Aprobado:**

	<b>Asesor</b>
	<b>Jurado</b>
	<b>Jurado</b>

## **DEDICATORIA**

*A mis padres y mis hermanos que siempre me dieron todo el apoyo y motivación para seguir siempre adelante, a mi novio por su apoyo incondicional y ánimo*

## **AGRADECIMIENTO**

**A DIOS    porque cuando DIOS ocupa el primer lugar en tu vida, todas las piezas restantes de tu vida encajan alrededor de El, en un orden perfecto**

**A la Dra Anayansi Valderrama, asesora principal de este estudio, por sus conocimientos, orientación, apoyo e infinita paciencia que fueron fundamentales para lograr este cometido**

**Al Dr Azael Saldaña y Dr Jose E Calzada por su valiosa asesoría y permitirme el desarrollo experimental de este proyecto de investigación en los laboratorios del Departamento de Investigación en Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES)**

**Al Sr Roberto Rojas, por su apoyo y enseñanzas en la identificación de las chitras**

**Al Dr Luis F Chaves, por sus aportes en los análisis estadísticos y en los resultados**

**Al Profesor Percis Garcés por sus observaciones en el manuscrito**

**A la Msc Lisbeth A Hurtado por sus aportes y apoyo durante la realización del manuscrito**

**A mis compañeros de Parasitología y Entomología Médica (ICGES) por su apoyo en diferentes procesos en el trabajo de campo y laboratorio, especialmente a Licda Milixa Perea, Licda Ana Rosa Caballero y el Sr José Montenegro**

## ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	7
INDICES DE CUADROS	9
INDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCION	13
1 MARCO TEÓRICO	16
1 1 Epidemiología de la Leishmaniasis en Panamá	16
1 2 Generalidades de los Flebótomos	20
1 2 1 Taxonomía y Distribución	20
1 2 2 Biología y Ecología	21
1 2 3 Ciclo de Vida	25
1 3 Infección por <i>Leishmania</i> spp	26
1 4 Ingesta sanguínea	30
2 HIPÓTESIS	35
3 OBJETIVOS	35
3 1 Objetivo General	35
3 2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIALES Y MÉTODOS	36
4 1 Área de Estudio	36
4 2 Colecta de los Especímenes	39
4 3 Extracción de ADN de pools de <i>Lutzomyia</i> sp	40
4 4 Amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de la región parcial del gen Internal transcribed spacer-1 (ITS-1) para detectar la infección natural por <i>Leishmania</i> spp	41
4 5 Amplificación por reacción de la cadena de polimerasa multiplex del gen Citocromo b para determinar la fuente sanguínea	42

4 6	Análisis de los datos	45
4 7	Aspectos Éticos	46
5	RESULTADOS	47
5 1	Composición y abundancia de las especies antropofílicas del género <i>Lutzomyia</i> en el domicilio y peridomicilio de las viviendas antes y después de una intervención con insecticida	47
5 2	Prevalencia de infección en las especies antropofílicas del género <i>Lutzomyia</i> presentes en la comunidad mediante el espaciador transcrito interno ITS-1	50
5 3	Tipos de Ingesta Sanguínea en las principales especies antropofílicas del género <i>Lutzomyia</i> , utilizando el marcador citocromo B de vertebrados	53
6	DISCUSIÓN	55
7	CONCLUSIONES	62
8	RECOMENDACIONES	63
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	ANEXOS	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1	Fluctuacion de los casos de Leishmaniasis reportados en Panamá	16
Fig 2	Formas clínicas de la Leishmaniasis	17
Fig 3	Porcentaje de los casos de Leishmaniasis reportados en las 14 regiones de Salud en la República de Panamá	18
Fig 4	Características de dimorfismo sexual entre el macho y la hembra de <i>Lutzomyia</i>	22
Fig 5	Ciclo de vida de los flebotomíinos	25
Fig 6	Ciclo de transmisión de la Leishmaniasis	28
Fig 7	Principales reservorios silvestres de leishmaniasis en Panamá	32
Fig 8	Ubicación geográfica de la Comunidad de Trinidad de las Minas en Panamá	36
Fig 9	Características de la vegetación de la comunidad de Trinidad de las minas	37
Fig 10	Características de las viviendas de la comunidad de Trinidad de las minas	38
Fig 11	Aplicación de termonebulización con Deltametrina en las viviendas durante el estudio	38
Fig 12	Trampas de luz HP colocadas dentro de la vivienda (domicilio) y afuera (peridomicilio)	39
Fig 13	Ubicación geográfica de las viviendas	40
Fig 14	Análisis de Correspondencia Simple de las especies antropofílicas asociadas al ambiente del intradomicilio y peridomicilio, Antes (Pre) y después (Post) de una intervención con insecticida	49
Fig 15	Resultados de la Electroforesis en gel de agarosa del PCR ITS-1 para detectar infección por <i>Leishmania</i> spp	50
Fig 16	Análisis de Correspondencia Múltiple de los pool analizados por PCR ITS-1	52
Fig 17	Análisis de Correspondencia Múltiple considerando las especies de <i>Lutzomyia</i> , PCR diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp y la ingesta de sangre de hospederos	54
ANEXOS		84
Fig 18	Distribución Global de la Leishmaniasis cutánea en el 2012	85
Fig 19	Actividades realizadas en la comunidad durante el estudio	86
Fig 20	Proceso de extracción de ADN de pool de chitras	87

<b>Fig 21</b>	<b>Proceso de preparación de mezcla de reacción (PCR)</b>	<b>88</b>
<b>Fig 22</b>	<b>Proceso de electroforesis</b>	<b>88</b>
<b>Fig 23</b>	<b>Análisis Filogenético realizado por el método de Maximum Likelihood</b>	<b>89</b>
<b>Fig 24</b>	<b>Electroforesis de PCR ITS-1</b>	<b>90</b>
<b>Fig 25</b>	<b>Electroforesis de PCR ITS-1</b>	<b>91</b>
<b>Fig 26</b>	<b>Electroforesis de PCR Multiplex</b>	<b>92</b>
<b>Fig 27</b>	<b>Electroforesis de PCR Multiplex</b>	<b>93</b>
<b>Fig 28</b>	<b>Electroforesis de PCR para aves en general</b>	<b>94</b>
<b>Fig 29</b>	<b>Electroforesis de PCR para aves en general</b>	<b>95</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro 1

Descripción de los Primer utilizados en el PCR ITS-1	41
--	----

### Cuadro 2

Descripción de los Primer utilizados en el PCR Multiplex	43
--	----

### Cuadro 3

Descripción de los Primer utilizados en el PCR de Mamífero y Aves en General	44
--	----

## INDICE DE TABLAS

### Tabla 1

Composición de las especies antropofílicas colectadas en las viviendas de la comunidad de Trinidad de las Minas, Capira	48
---	----

### Tabla 2

Prevalencia de infección por <i>Leishmania</i> spp en pool de <i>Lutzomyia</i> antes y después de la aplicación de dos rondas con termonebulización con insecticida deltametrina en Trinidad de Las Minas, Panamá	51
---	----

### Tabla 3

Números de pool asociados a diferentes fuentes sanguíneas para cada especie de flebotomíinos	53
--	----

## ABREVIATURAS

ACS Análisis de Correspondencia Simple

ACM Análisis de Correspondencia Múltiple

ADN Acido Desoxirribonucleico

rARN Acido Ribonucleico ribosomal

Cyt b Citocromo b

ITS-1 Espaciador Transcripto Interno 1 (internal transcriber spacer 1)

LCA Leishmaniasis Cutánea Americana

LC Leishmaniasis Cutánea

Le *Leishmania*

LMC Leishmaniasis Mucocutánea

LT Leishmaniasis Tegumentaria

Lu *Lutzomyia*

LV Leishmaniasis visceral

OMS Organización Mundial de la Salud

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

RFLP Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

Spp especies (plural)

Sp especie (singular)

SSU Subunidad pequeña del rRNA (Small Subunit)

## RESUMEN

La comunidad de Trinidad de las Minas en el Distrito de Capira, Provincia de Panamá Oeste, se encuentra en una región con alta transmisión de leishmaniasis cutánea. Se registran entre 137 a 508 números de casos por año, con una incidencia que corresponde al 20% con respecto a todo el país. El presente trabajo tiene como finalidad demostrar mediante análisis moleculares la prevalencia de infección por *Leishmania* spp y los tipos de ingesta sanguínea en las especies de flebotomos más abundantes en el domicilio y peridomicilio, antes y después de una intervención con insecticida (Deltametrina). Utilizando trampas de luz HP se colectaron los flebotominos desde abril 2010 a junio de 2011, dentro (domicilio) y alrededor (peridomicilio) de 24 viviendas. De 455 grupos analizados se obtuvieron 164 grupos positivos de las especies de flebotominos incriminadas en la transmisión de leishmaniasis en Panamá: *Lutzomyia trapidoi*, *Lu gomezi* y *Lu panamensis*. La prevalencia estimada a un nivel de confianza de 95% para grupos de tamaño de muestra variables fue de 0.025 a 0.038 antes y después de la intervención realizada en la comunidad. En la detección de la ingesta sanguínea resultó que las aves y los cerdos son de preferencia alimentaria, seguido por los humanos y los perros, indicando que son las principales fuentes alimentarias de preferencias por estos vectores. Con las variables evaluadas se demuestra una dinámica entre la tasa de infección e ingesta sanguínea antes y después de una fumigación con un insecticida utilizado comúnmente para el control químico de mosquitos, sugiriendo la influencia de este tipo de intervención sobre la biología de estos vectores. Los resultados confirman la infección de las principales especies de flebotominos antropofílicos con *Leishmania* spp en este foco de transmisión y sustentan una estrecha asociación entre estas especies, los humanos y algunos animales domésticos.

## ABSTRACT

The community of Trinidad de las Minas in the District of Capira, Province of West Panamá, is located in a region where an intense transmission of cutaneous leishmaniasis (CL) have been reported. In this area, the increase of CL cases ranges between 137 to 508 per year, with an incidence that corresponds to 20% of the whole country. The purpose of this work is to demonstrate in this community, the prevalence of *Leishmania* spp infection and host-blood feeding in anthropophilic and zoophilic sandflies, before and after vector control intervention with insecticide thermal fogging (ITF). From April 2010 to June 2011, sandflies were collected using CDC light traps, inside (domicile) and around (peridomicile) of 24 houses. Of 455 analyzed pools, 253 resulted positives for PCR-ITS1. Of them, 164 correspond to important leishmaniasis vectors found in this community: *Lutzomyia trapidoi*, *Lu gomezi* and *Lu panamensis*. The estimated prevalence to 95% for variable pool size and perfect tests was 0.025 to 0.038 before and after the intervention respectively. In the detection of host-blood feeding, it was found that birds and pigs were the main sources of blood, followed by humans and dogs. These findings demonstrate the dynamics of *Leishmania* infection and blood feeding in vector sandflies, before and after an ITF, a method often used to control mosquitoes and other arthropods in Panama. The results confirm the infection of the main species of anthropophilic sandflies with *Leishmania* spp in this hyperendemic focus of CL. A close association between these vector species, humans and some domestic animals was also supported.

## INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis está presente en cuatro de los cinco continentes y es endémica en 98 países, con más de 350 millones de personas actualmente en situación de riesgo (Anexo Fig 20) Aproximadamente 1,3 millones de nuevos casos se producen anualmente, de los cuales 300,000 son de la forma visceral y 1 millón son de la cutánea o mucocutánea (WHO, 2014)

En Panamá, la LC es una de las zoonosis parasitaria más frecuentes, y un problema de salud importante, con una estimación de 3,000 casos nuevos por año (60-100 nuevos casos por 100,000 habitantes), aunque es probable una subestimación del 50% en este número (Miranda et al, 2009) Esta infección se concentra entre la población marginada de Panamá, un factor que conduce a un aumento de la desigualdad y limita las oportunidades de desarrollo humano en el país (Vásquez et al, 1998, Chaves et al, 2008)

El 82% de estos casos provienen de zonas rurales y de poco acceso en las provincias de Bocas del Toro (29%), Coclé (16%), Panamá Oeste (17%), Colón (11%), Panamá Este (5%) y Darién (4%), según los informes epidemiológicos del Ministerio de Salud (Minsa, 2015) Una de las posibles causas del incremento de la enfermedad es la alteración de la ecología de las poblaciones silvestres tanto del vector como de los hospederos, inducido por la fragmentación descontrolada de los bosques (Travi et al, 2002)

Esta infección es transmitida por la picadura de pequeños insectos dípteros flebotómicos localmente conocidos como chitras, siempre asociados con ambientes boscosos y la presencia de animales silvestres que sirven como reservorios de la infección (Vásquez et al, 1994, Valderrama et al, 2008) Estos flebotómicos se desarrollan en lugares húmedos, tales como nidos, grietas de las rocas, madrigueras de animales y corteza de árbol (Christensen et al 1983)

*Leishmania (Viannia) panamensis* es el agente causal mayormente involucrado en la LC en Panamá (Miranda et al, 2009, 2012, Chaves et al, 2014), no obstante los reservorios

mamíferos juegan un papel importante en la epidemiología y la transmisión de *Leishmania* spp, debido a su papel como fuentes de infección para los flebótomos vectores y los seres humanos (Christensen et al, 1983, Chaves et al, 2004, González et al, 2015)

Varias especies de mamíferos silvestres, incluyendo perezosos y roedores, fueron identificados como reservorios de parásitos causantes de LC durante estudios pioneros sobre la eco-epidemiología de la enfermedad en Panamá (Christensen et al, 1983, Telford et al, 1972, Herrer y Christensen, 1980) El perezoso *Choloepus hoffmanni* es el principal reservorio del parásito, pero otros mamíferos silvestres, como *Bradypus variegatus*, *Sagumus geoffroyi*, *Nasua Nasua*, *Potos flavus*, *Bassaricyon gabbi*, *Proechimys semispinosus*, *gymnurus Hoplomys* y *Coendou rothschildi*, también han sido identificados como reservorios y se ha establecido su papel como huéspedes secundarios (Christensen et al, 1984, Méndez 1999, Valderrama et al, 2011)

La evidencia obtenida hasta el momento del rol de los perros como reservorios de leishmaniasis tegumentaria es circunstancial, estos animales no han demostrado tener capacidad para actuar como reservorio funcional (Reithinger y Davies, 1999, Padilla et al, 2002, Marco et al, 2005) Por lo tanto el papel epidemiológico de los mamíferos domésticos no está totalmente claro, sin embargo la infección canina es aparentemente frecuente en comunidades endémicas (Calzada et al, 2015)

Los habitantes de las comunidades rurales ubicadas al oeste del Canal de Panamá con frecuencia son afectados por esta enfermedad parasitaria (Saldaña et al, 2013) Durante los últimos 10 años se han observado importantes variaciones en el número de casos reportados de LC en esta región del país (de 300 a 890 casos/años) (Minsa, 2014) El aumento de los casos de leishmaniasis es debido a una combinación de múltiples factores, que implica cambios en el clima, comportamientos humanos, vectores y reservorios El patrón cambiante de la dispersión y la distribución espacial de los flebotomos a nuevas ubicaciones son factores críticos que pueden implicar un aumento del riesgo del contacto humano-vector (Valderrama et al, 2011)

El conocimiento de los posibles reservorios implicados en un área afectada con leishmaniasis es esencial a la hora de decidir que se necesitan medidas de control a tomar. En este sentido, el estudio de las fuentes de ingesta sanguínea de los vectores juega un papel esencial (González E et al, 2015). La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación se utiliza ampliamente para estudiar las preferencias de ingesta sanguínea en los flebotomíneos y otros vectores como mosquitos o garrapatas (Kirstein y Gray 1996, Oshagi et al, 2006, Danabalan et al, 2014). Por lo tanto, diferentes técnicas moleculares como citocromo b (cyt b), citocromo oxidasa I (COI) y ceptin prepronociceptin (PNOC) se utilizan para detectar el origen de las ingestas sanguíneas (Kocher et al, 1989, Haoaus et al, 2007, Abassi et al, 2009, González E et al, 2015).

El estudio de estas características eco-epidemiológicas de los flebotomíneos permite evaluar los patrones de dispersión, mejorar el diseño de las estrategias de vigilancia vectorial y planificar medidas de prevención particulares para cada área endémica.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS EN PANAMÁ

Históricamente, los casos de LC en Panamá han fluctuado de manera irregular (Fig. 1), quizás reflejando periodos epidémicos. Sin embargo, estas fluctuaciones también pueden deberse en parte al considerable subregistro, debido a que esta enfermedad nunca ha sido monitoreada sistemáticamente en todo el país (Alvar et al, 2012).

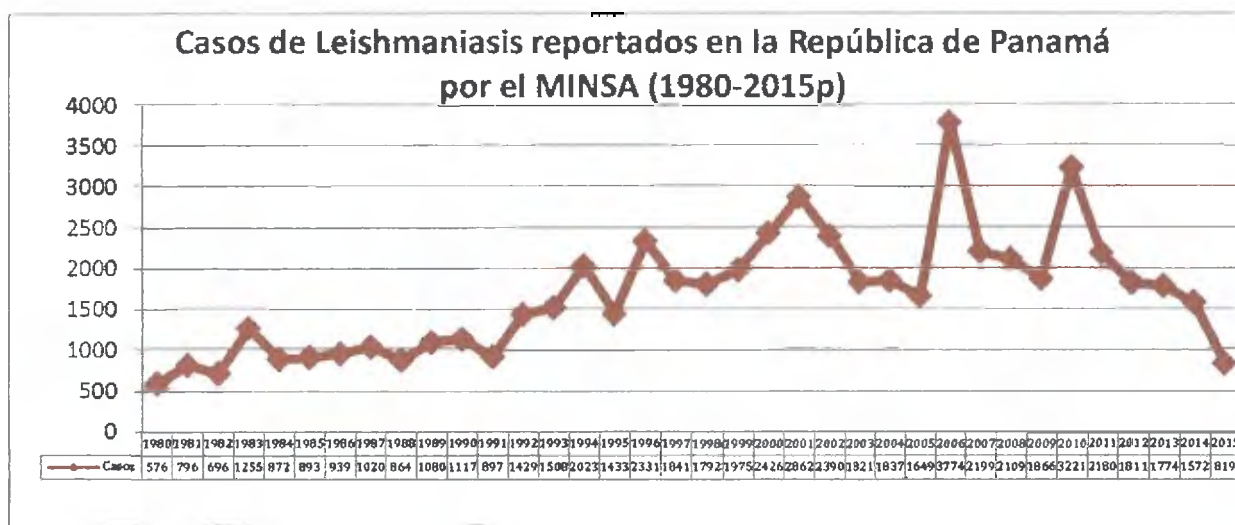


Fig. 1: Fluctuación de los casos de leishmaniasis reportados en Panamá desde 1980-2015p (Fuente: Informe de Epidemiología del MINSA 1980- 2015p)

La leishmaniasis cutánea es la forma más común de leishmaniasis reportada en la República de Panamá; sus manifestaciones clínicas van desde lesiones menores hasta úlceras graves en la piel (Christensen et al. 1972, 1983, 1984; Miranda et al, 2009).

Por lo general, produce úlceras en las partes expuestas del cuerpo, como la cara, brazos y piernas. Puede haber un gran número de lesiones (a veces hasta 200) que puede causar incapacidad grave. Cuando las úlceras se curan, invariablemente dejan cicatrices permanentes. Las lesiones mucocutánea pueden conducir a la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, las cavidades y tejidos circundantes de la boca y la garganta (Fig. 2). Hay una carga psicosocial asociado con las deformidades de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea que pueden conducir a la exclusión de la sociedad



debido a la creencia errónea de que la enfermedad es directamente contagiosa (WHO, 2014).



Fig. 2: Formas clínicas de la Leishmaniasis: Cutánea, Mucocutánea y Visceral (izq. a der).

En Panamá se registró por primera vez en 1910. Un total de 15 casos se reportaron durante 1910-1944. Desde 1977 ha aumentado el número de casos de LC, la causa principal de este aumento era el creciente número de personas que emigraron a nuevos asentamientos en las zonas endémicas (regiones del norte, este, y centro-sur) (Darling, 1910; Valderrama et al, 2011).

Informes epidemiológicos del Ministerio de Salud indican que desde 1980-1999 se reportaron 25,337 casos de LC y en los últimos años del 2000 al 2015, se han reportado 34,310 casos que se distribuyeron en las 14 regiones de salud del país: Bocas del Toro (29%), Coclé (16%), Colón (11%), Chiriquí (2%), Darién (4%), Herrera (0.1%), Los Santos (0.3%), Panamá Metropolitana (5%), Panamá Este (5%), Panamá Oeste (17%), San Miguelito (3%), Ngobe Buglé (4%), Guna Yala (0.2%) y Veraguas (4%), según datos publicados por la Sección de Epidemiología, de la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Salud de Panamá (Minsa, 2015) (Fig. 3).



Fig. 3: Porcentaje de los casos de Leishmaniasis reportados en las 14 regiones de Salud en la República de Panamá (Fuente: Informe anual del Depto. De Epidemiología del Ministerio de Salud, 2015).

Recientemente, algunos investigadores han sugerido una tendencia al aumento en el número de casos de LC, y se atribuye a diversos factores de riesgo:

- 1- Falta de tratamiento médico: en parte porque los que están más afectados viven en zonas remotas y con frecuencia no buscan atención médica (Miranda et al, 2009; WHO, 2014).
- 2- Malnutrición: Las dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A y zinc aumentan el riesgo de que la infección progrese (OMS, 2015).
- 3- Condiciones socioeconómicas: la pobreza aumenta el riesgo de leishmaniasis. Las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares (por ejemplo, la ausencia de sistemas de gestión de residuos, alcantarillado abierto) pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebotominos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebotominos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre. Las pautas de comportamiento humano (por

ejemplo, dormir a la intemperie o en el suelo) también es probable que aumenten el riesgo. El uso de mosquiteros tratados con insecticida reduce el riesgo (OMS, 2015)

- 4- Movilidad de la población: el aumento de la migración humana en las zonas endémicas de leishmaniasis que exponen a las personas no inmunes a la transmisión (Aagaard-Hansen et al, 2010). La exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación siguen siendo factores importantes. Por ejemplo, asentarse en zonas previamente boscosas significa acercarse al hábitat del flebotomino, lo que puede llevar a un aumento rápido del número de casos (OMS, 2015)
- 5- Cambios ambientales y ecológicos que desencadenan la adaptación del vector a los asentamientos humanos en el medio ambiente de los ecosistemas de bosques alterados que pueden influir en la dinámica de la infección, lo que hace un control aún más difícil (Zeledón, 1992, Crum et al, 2005, Valderrama et al, 2008, Restrepo et al, 2011, Saldaña et al, 2013, Calzada et al, 2013, Chaves et al, 2013, Dutary y Loaiza, 2014)
- 6- Cambio Climático: La leishmaniasis es sensible a las condiciones climáticas, y los cambios en las precipitaciones, la temperatura y la humedad influyen en gran medida en la enfermedad. El calentamiento de la tierra y la degradación del suelo afectan en muchos aspectos a la epidemiología de la leishmaniasis, por ejemplo los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población, pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un acusado efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica, las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a desplazamientos masivos y la migración de personas hacia zonas de transmisión de la leishmaniasis, y la

desnutrición puede debilitar la inmunidad de las poblaciones afectadas (OMS, 2015)

## **1.2 GENERALIDADES DE LOS FLEBOTOMINOS**

### **1.2.1 Taxonomía y Distribución**

Los flebotominos (del griego *phlebos*, vena y *tomos*, cortar) son pequeños insectos categorizados taxonómicamente dentro del Orden Diptera, Suborden Nematocera, Familia Psychodidae Newman, 1834, subfamilia Phlebotominae Rondani, 1856 (Contreras G, 2013)

En general, se consideran 7 géneros descritos dentro de la subfamilia Phlebotominae *Phlebotomus* Rondani y Berté 1840, *Sergentomyia* Rondani y Berté 1920, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* França y Parrot 1921, *Warileya* Hertig 1948, posteriormente, Leng (1987) incluye el género monoespecífico *Chimus* y Galati (2003) considera al género *Hertigia* Fairchild 1949 dentro de la subfamilia Phlebotominae

En América ocurren los géneros *Brumptomyia*, *Warileya*, *Hertigia* y *Lutzomyia* (Young y Duncan 1994, Bejarano 2006, Galati 2003, Galati 2010) El género *Brumptomyia* lo conforman 26 especies asociadas con ecosistemas conservados (Barrett et al, 1996, Bejarano, 2006) y se distribuyen desde el sur de México hasta el norte de Argentina (Young y Duncan, 1994, Ibáñez, 1999, Ibáñez et al, 2006) El género *Warileya* agrupa ocho especies distribuidas desde Costa Rica hasta Bolivia (Young y Duncan, 1994, Galati, 2010) y el género *Hertigia* es considerado monotípico registrado solo para Costa Rica y Panamá (Lewis et al, 1977, Galati, 2003, 2010) Las especies de estos tres géneros no son hematófagas y no presentan implicación alguna en la transmisión de agentes patógenos que afecten al humano (Young y Duncan, 1994, Mustermann, 2004) Por el contrario, en el género *Lutzomyia* se ubican todas las especies de interés en salud pública

Las revisiones realizadas por Martins, Williams y Falcão (1978) y Young y Duncan (1994), así como la documentación electrónica producida por el grupo CIPA (Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America) (<http://cipa.snv.jussieu.fr/>) constituyen documentos imprescindibles en el estudio de la sistemática, taxonomía y distribución geográfica de este grupo de insectos en América

### **1.2.2 Biología y Ecología**

En Panamá los vectores de la leishmaniasis (*Lutzomyia*) son conocidos comúnmente como “chitras” (Valderrama et al, 2008). Son insectos con metamorfosis completa (holometábolos) que incluye la fase de huevo, larva, pupa y el adulto (Molina, 1994, Young y Duncan, 1994, Killick-Kendrick 1999, Munstermann, 2004).

Estos dípteros son insectos pequeños, de 3 a 5 mm de longitud, no poseen ocelos. Su coloración general es amarillenta o castaña. Los ojos son grandes y redondos. Las antenas son alargadas, filiformes con 16 segmentos con setas ampliamente esparcidas. Sus apéndices bucales forman una proboscis que consiste del labro-epifaringe, hipofaringe, dos mandíbulas y dos maxilas. El tórax es algo robusto con una clara separación entre el protórax y mesotórax. Las alas son lanceoladas, relativamente grandes y setosas (Eldridge y Edman, 2000).

El abdomen consta de seis a ocho segmentos. En el macho se destaca una genitalia conspicua la cual es fuerte y capaz de sujetar a la hembra durante la fecundación para depositar su semen en la espermateca de ésta. Los últimos segmentos abdominales en la hembra constituyen dos lóbulos laterales y dos cerci (Fig 4) (Eldridge y Edman, 2000).



Fig. 4: Características de dimorfismo sexual entre el macho y la hembra de *Lutzomyia* (Fuente: <https://www.emaze.com/@ATROWOW/Flebotomos>).

Los adultos de ambos sexos se alimentan de los azúcares producidos por las plantas, áfidos y/o coccidios (Lucientes et al. 2005). Las hembras también son hematófagas, condición necesaria para la maduración de los huevos (Zhioua y Chelbi, 2005). Las fuentes sanguíneas están representadas por hospederos vertebrados endotérmicos (ganado, perros, roedores y hombre) y los vertebrados exotérmicos, como los reptiles y anfibios (Depaquit y Léger, 2007).

En cuanto a la forma de alimentación, los flebotominos son considerados telmófagos, es decir que la hembra para alimentarse debe cortar con su aparato bucal la piel y producir la ruptura de los vasos sanguíneos y luego de la formación de una acumulación de sangre, la hembra se alimenta (Lucientes et al. 2005; Munstermann, 2004; Depaquit y Léger, 2007).

Es esta necesidad de alimentarse, la que conduce a desempeñar el papel como vector demostrado, natural y experimentalmente, de diversos agentes patógenos para los seres humanos (KillickKendrick, 1999; Munstermann, 2004, Contreras, 2013).

Para ser considerado vector de riesgo para el ser humano de *Leishmania* sp , una especie de flebotomíinos debe cumplir con una serie de criterios (Young y Lewyer, 1987, Killick y Kendrick, 1990)

- 1) Antropofilia y zoofilia,
- 2) desarrollo del parásito en el intestino,
- 3) contacto vector–humano,
- 4) presencia del parásito y de la especie de insecto en la misma zona geográfica,
- 5) identificación del parásito aislado del hombre, del insecto y del reservorio en repetidas ocasiones,
- 6) determinar la capacidad de transmitir el parásito por picadura

Y más recientemente se ha incorporado la correlación estadística entre abundancia y distribución de flebotómicos, y la incidencia de la enfermedad (Vásquez Trujillo, 2011) En muchas ocasiones estos criterios son difíciles de probar en su conjunto y diversos autores involucran vectores de manera condicional en diferentes áreas, aunque con suficiente evidencia molecular y/o ecológica de su participación en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis (Salomón et al, 2009, 2010, Fernández, 2012)

Las "chitras" al igual que otros Phlebotominae son de condición terrestre y arbórea. Suelen reposar en los huecos de los árboles, cuevas, termiteros, madrigueras de roedores y de otros animales, grietas y las oquedades de rocas o en la corteza de ciertos árboles. Estas son áreas que mantienen la humedad favorable y las protegen la luz y del viento. Estas mosquitas son activas en la noche, durante el crepúsculo y en días oscuros, siempre y cuando no haya viento. Su vuelo es lento, silencioso, interrumpido y de un alcance limitado, el cual, generalmente fluctúa entre 100-200 metros, no obstante, bajo la influencia del viento, alcanzan una distancia mayor (Méndez, 1999)

Los adultos de algunas especies de "chitras" tienen un fototropismo positivo, por lo que son atraídos por la luz en áreas rurales y a veces penetran en las habitaciones humanas,

gallineros, establos y otros recintos, pudiéndose realizar una transmisión dentro de las áreas habitadas por el hombre (Méndez, 1999)

La identificación de los flebotomíneos se basa en características morfológicas, tanto del macho como de la hembra, principalmente de las genitales, la longitud y disposición de las venas de las alas y el aparato picador (faringe y cibarium). Para resolver problemas de identificación, se dispone de técnicas como la electroforesis de isoenzimas, la cromatografía en fase gaseosa y las sondas de ADN (Arias et al, 1996)

Hay cerca de 900 especies, las cuales tienen una amplia distribución mundial en áreas tropicales y subtropicales, desde bajas altitudes a nivel del mar, hasta los 3 200 msnm aproximadamente (Young y Duncan, 1994, Montoya-Lerma y Ferro, 1999, Contreras, 2013). En Panamá solo 74 de estas especies se encuentran distribuidas en zonas boscosas (Feliciangeli, 1988, Christensen, 1972, Herrer y Christensen, 1976, Valderrama et al, 2008)

La evidencia de estudios panameños sugiere que hay seis especies de *Lutzomyia* o "chitras" transmisoras de LC en áreas endémicas de Panamá: *Lu. trapidoi* (Fairchild & Hertig), *Lu. panamensis* (Shannon), *Lu. ylephiletor* (Fairchild & Hertig), *Lu. gomezi* (Nitzulescu), *Lu. sanguinaria* (Fairchild & Hertig) y *Lu. carrerai thula* (Young) (Christensen y Herrer, 1973, Young y Duncan, 1994, Valderrama et al, 2008, Dutari y Loaiza, 2014)

En general, estas especies son oportunistas, lo que los convierte en potenciales transmisores de patógenos a través de rango de hospederos de animales silvestres, animales domésticos y los seres humanos. Sin embargo, como se ha señalado antes, en determinadas circunstancias algunas especies pueden también ser hospederos-específicos (Dutari y Loaiza, 2014)



### 1.2.3 Ciclo de Vida

El desarrollo de los flebotominos ocurre a lo largo de varios estados de desarrollo: huevo, larva (4 instares larvales), pupa y adulto (Fig. 5) (Young y Duncan, 1994).

El ciclo de vida completo dura alrededor de 45 días. En estudios efectuados en colonias experimentales se han registrado rangos que varían desde los 26 a 56 días a partir del huevo hasta la eclosión de los adultos, o de 59 a 121 días considerando el ciclo completo, dependiendo de la especie, de los recursos disponibles y de las condiciones de humedad y temperatura en el ambiente y sustrato (Rangel et al, 1985, 1986; Escovar et al, 2004; Fernández, 2012).

Se ha registrado que en condiciones de temperatura por encima de las consideradas óptimas por ensayos de laboratorio para la mayoría de las especies neotropicales (25°-27°) el ciclo biológico se completa de manera más rápida; y a medida que la temperatura disminuye el ciclo se torna más lento (Sherlock et al, 2003).

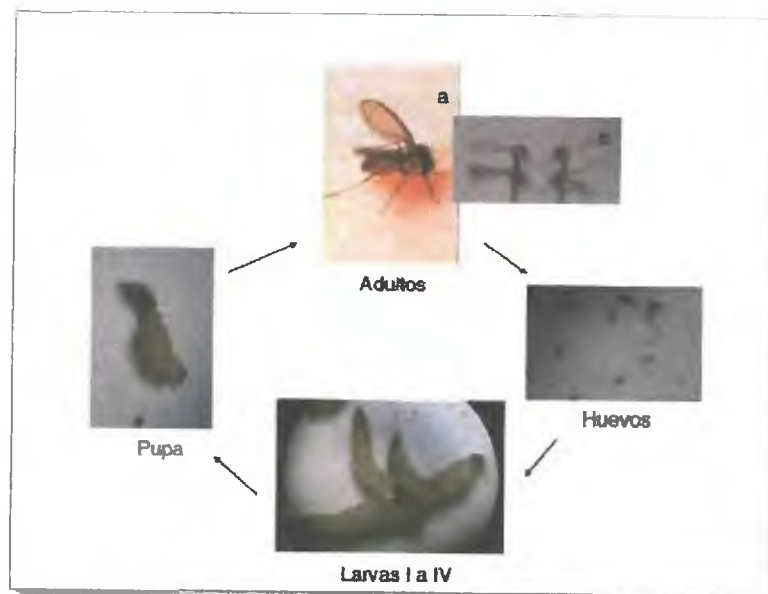


Fig. 5: Ciclo de vida del flebotomino. a) Adultos <5mm, huevos 0,3 mm de longitud y 0,10mm de ancho; larvas 0,4 a 0,7mm y pupas 2,5 a 2,8mm (Fuente: WHO/TDR/Stammers, Fiocruz Salvador, Brasil, CeNDIE).

En relacion a la humedad, se han obtenido resultados de ciclos completos en colonias experimentales trabajando con una humedad relativa de alrededor del 80% (Rangel et al, 1985), siendo que la mayoría de las especies neotropicales no sobreviven en condiciones de humedad relativa menores al 50% (Sherlock et al, 2003)

Los huevos son ovalados, de 0.350 mm de largo por 0.100 mm de ancho, con superficie escamosa, y dibujos de interés taxonómico (Zimmerman *et al*, 1977) y la postura se realiza en áreas sombreadas con elevada humedad relativa, temperatura constante, con suelos arenosos ricos en materia orgánica, que permiten alimentar las larvas cuando eclosionan (Dougherty *et al*, 1992, Young y Duncan, 1994, Munstermann, 2005)

Las larvas sufren tres mudas (larvas I a IV) antes de pasar a pupa a partir de la cual emerge el adulto. Una vez producida la muda imaginal, la hembra tarda entre 1 y 4 días en hacer su primera ingesta de sangre y de 3 a 10 días despues realiza la primera ovipostura, que pueden llegar a ser de hasta alrededor de 100 huevos (Salomón, 2005), pero con un amplio rango de variación (Rangel et al, 1985). La longevidad de los adultos en condiciones naturales es prácticamente desconocida, pero estudios de laboratorio han demostrado que en condiciones controladas pueden vivir entre 20 y 30 dias (Sherlock et al, 2003)

### **1.3. INFECCIÓN POR *LEISHMANIA* SPP.**

Los parásitos del género *Leishmania* son organismos unicelulares pertenecientes al reino Protozoa, orden Kinetoplastida, familia *Trypanosomatidae*, se divide en dos subgéneros (*Leishmania* y *Viannia*), el subgénero *Leishmania* se divide a su vez en cinco complejos, *donovani*, *trópica*, *major*, *aethiopica* y *mexicana*, el subgénero *Viannia* en *braziliensis* y *guyanensis* (Bermudez et al, 2005)

Los complejos *braziliensis*, *mexicana* y *donovani* son los principales agentes de la leishmaniasis en muchas áreas tropicales y subtropicales de América, donde los humanos son solo huéspedes accidentales en el ciclo de vida del parásito. Los protozoarios

flagelados de este género son capaces de producir un amplio espectro de enfermedades en los humanos que van desde algunas infecciones asintomáticas a horribles lesiones desfigurantes del rostro como el caso de la leishmaniasis mucosa (espundia), o a la fatal forma visceral de la enfermedad (Miranda et al, 2009)

En Panamá, se han descrito cuatro especies de *Leishmania* potencialmente patógenos para los seres humanos *Le (Viannia) panamensis*, *Le (Leishmania) mexicana*, *Le (Leishmania) amazonensis* y *Le (Viannia) colombiensis*. La más frecuente es *Le (Viannia) panamensis*, extendida por todo el país y responsable de la mayoría de los casos diagnosticados en el Instituto Conmemorativo Gorgas (Christensen et al, 1972, Vásquez et al, 1998, Miranda et al, 2009, Chaves et al, 2014)

Se han reportado pocos casos esporádicos de LTA causadas por *Le mexicana* y *Le amazonensis* (De Vasquez et al, 1990, Christensen et al, 1999). *Le colombiensis* fue aislada de cuatro flebótomos y un perezoso en Panamá (Kreutzer et al, 1991). Otras dos especies de *Leishmania* han sido reportados en Panamá pero nunca se han aislado de seres humanos *Le hertigi*, que tiene como reservorio natural el puercoespín (*Coendou rothschildi*), con una tasa muy alta de infección (89%) y *Le aristidesi* se aisló a partir de *Oryzomys capito*, *Agouti paca*, *Marmosa robinsoni* y *Proechimys semispinosus* (Herrer, 1971, Herrer et al, 1971, Miranda et al, 2009). Otra cepa, *Le naiffi*, se ha encontrado recientemente en las poblaciones de *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia trapidoi*, pero no se ha documentado la infección en humano, ni se conoce sus reservorios (Azpurua et al, 2010, Valderrama et al, 2011)

En la naturaleza las especies de *Leishmania* son transmitidas por la picadura de un insecto flebotomino hembra infectada. Estos parásitos tienen dos estadios distintos en su ciclo de vida (Fig 6), una forma móvil flagelada que vive extracelularmente en el tracto digestivo del insecto vector llamado promastigote y una forma no flagelada que se encuentra intracelularmente en el sistema fagocítico mononuclear del huésped vertebrado, el amastigote (Bermudez et al, 2005, Reithinger et al, 2007)

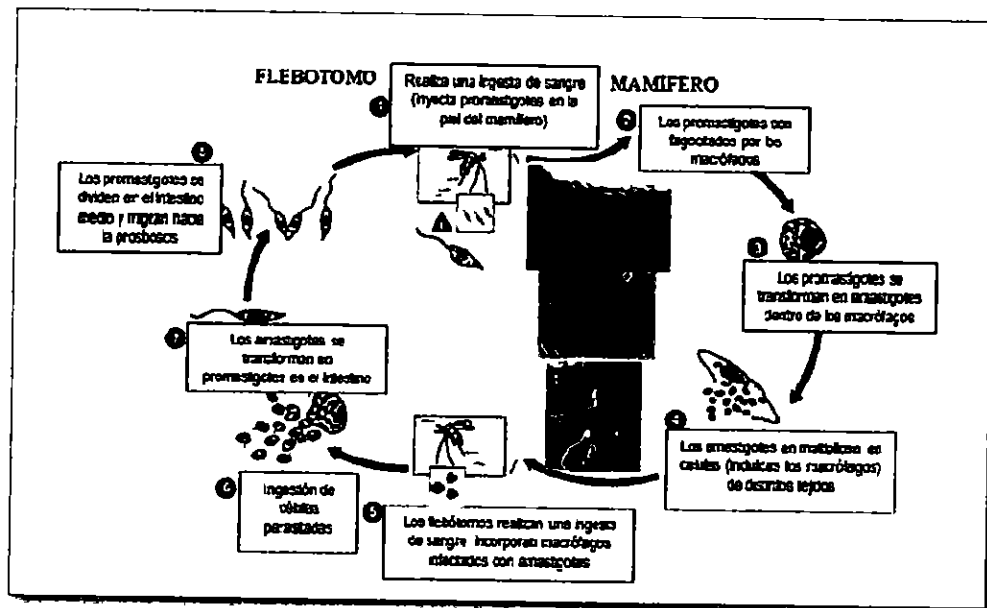


Fig. 6 Ciclo de transmisión de la Leishmaniasis (adaptado de "Centre for diseases control and prevention – CDC-, <http://www.cdc.gov/>) No todos los mamíferos (silvestres, comensales, domésticos, e incluso el hombre) contraen la enfermedad y/o funcionan como reservorios esto es dependiente del agente etiológico, de la especie del vector involucrado y de los escenarios de transmisión

Las condiciones del ecosistema donde se realizan los muestreos, permite suponer que la relación de los flebotominos con la aparición de casos de leishmaniasis podría estar definida por varios factores. La deforestación, que ejerce un efecto negativo en la abundancia y diversidad de los flebotominos y expone a la población humana a la picadura de las especies antropofílicas aumentando la posibilidad de infectarse (Travi et al 2002, Silva et al 2007). Así mismo, actividades diarias necesarias para el sostenimiento de la población, como la agricultura y la migración fluvial, también podrían influir directamente en la aparición esporádica o en el establecimiento de un foco de leishmaniosis cutánea en esta área (Arias et al, 1996).

El tratamiento y el pronóstico tienen que ser individualizados, haciendo esencial el diagnóstico específico de la especie del parásito (Grevelink y Lerner, 1996). Aparte de las diferencias mínimas en la distribución de *Leishmania* en el tracto digestivo del vector (Shaw y Lainson, 1987), las formas flageladas de este parásito son indistinguibles entre

las especies, lo específico del diagnóstico en investigación microscópica óptica rutinaria es imposible (Michalsky et al , 2002) Los flebótomos deben ser frescos, y se necesita una considerable habilidad y experiencia para el estudio de estos pequeños individuos Aunque el procedimiento toma un tiempo relativamente largo, un gran número de muestras tienen que ser examinados para obtener datos informativos para cada área, debido a que la tasa de infección del flebotomino con *Leishmania* es generalmente muy baja (0,01-1%), incluso en zonas endémicas (Kato et al, 2007)

En las regiones endémicas, varias especies de *Leishmania* pueden coexistir La identificación de las especies que infectan, basados en los síntomas clínicos es difícil, ya que varias especies pueden causar tanto LC y LMC (Monroy-Ostria et al, 2014), debido a esto los enfoques moleculares han permitido recientemente el diagnóstico de enfermedades infecciosas basados en la reacción de la cadena de la polimerasa de (PCR) Esta técnica ha permitido la identificación de varias especies de parásitos (Oskam et al , 1996, Arez et al , 2000) y podría ser valiosa en la detección de *Leishmania* en los flebótomos (Cabrera et al , 2002, Santamaria et al, 2005)

Además, los informes indican que la respuesta a fármacos terapéuticos pueden variar entre diferentes especies presentes en la misma zona (Romero et al, 2001) La confirmación diagnóstica y la correcta identificación de las especies de *Leishmania* son importantes para las apropiadas terapias especies-específicas, así como estudios epidemiológicos (Monroy-Óstria et al, 2014)

El enfoque de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollado como una alternativa a los procedimientos de diagnóstico existentes, tales como la detección directa de los parásitos mediante examen microscópico de las muestras clínicas o por el cultivo Varios dianas moleculares para una PCR de diagnóstico se han evaluado en *Leishmania* incluyendo minicircle cinetoplasto ADN (kDNA) (Hernández-Montes, 1998), el gen minixon (RNA empalmados líder) (Fernandez et al, 1994), la gp63 PCR-RFLP (Victoire

et al, 2003) y el espaciador transcrito interno (ITS) entre otros (Davila y Momen, 2000, Bensoussan et al, 2006, Reithinger y Dujardin, 2007)

#### **1.4. INGESTA SANGUÍNEA**

Los hospedadores reservorios de *Leishmania* spp (Mamífero que mantiene el parásito circulando en la naturaleza) es conocido sólo en algunos escenarios de transmisión y se han descrito diferentes reservorios de leishmaniasis, según las características del ciclo de transmisión (región geográfica del planeta, bioma, el o los agentes etiológicos, el o los vectores involucrados) (Fernández, 2012) El mantenimiento del ciclo ecológico de la *Leishmania* involucra muchas veces un número pequeño de especies vectores y reservorios vertebrados (WHO, 2010)

También pueden existir mamíferos que, aunque contraigan la infección no juegan un papel en el mantenimiento del sistema ecológico, estos son los hospederos accidentales. Los reservorios, sean silvestres o domésticos, pueden o no mostrar signos de la infección y en algunos casos también pueden morir a causa de ella. La incriminación de un hospedador reservorio o comunidad de reservorios en muchos de los escenarios de transmisión de *Leishmania* spp suele ser dificultosa, pero una vez que esto ocurre se torna una información valiosa para estudiar la dinámica de la infección (Ashford, 1997, Haydon et al, 2002, Fernández, 2012)

Los criterios definidos para la incriminación de reservorios de *Leishmania* spp, según la WHO (2010) son

- 1) un reservorio debería ser suficientemente abundante y longevo para proveer de una fuente de sangre significativa a los vectores,
- 2) debe existir contacto intenso entre vectores y reservorios, por ejemplo, el contacto existente entre vectores y reservorios en cuevas y refugios,
- 3) la proporción de individuos infectados en la población debería exceder el 20%, aunque esta prevalencia puede variar de manera estacional,

- 4) el periodo de infección en el reservorio debería ser suficientemente largo y la infección debería ser suficientemente no patogénica como para permitir a los parásitos sobrevivir en alguna estación donde no exista transmisión, y
- 5) los parásitos deben estar disponibles en la piel o en la sangre en número suficiente para ser tomados por los vectores

Es muy amplia la lista de mamíferos domésticos o silvestres incriminados como reservorios e incluye a marsupiales, cánidos, roedores, edentados, insectívoros, equinos y primates, incluido el hombre, dependiendo del contexto eco-epidemiológico (Fig 7) (Telford, et al, 1972, Herrero y Christensen, 1980, Christensen et al, 1983, Grimaldi y Tesh, 1993, Ashford, 1996, WHO, 2010, Santamaría et al, 2006, Ready, 2008, Fernández, 2012, Gonzalez et al, 2015)

Para el caso de las *Leishmania* spp causantes de leishmaniasis tegumentarias, el o los reservorios aun no han sido incriminados con certeza para la mayor parte de las especies que circulan en la región neotropical. Se han realizado diversos estudios que indican que los roedores y/o edentados podrían estar actuando como reservorios (Mello y Barbosa, 1985, Ashford, 1996)



Fig 7. Principales reservorios silvestres de leishmaniasis en Panamá

Ashford (1997), menciona para el nuevo mundo a los edentados *Choloepus* spp. (Megalonychidae) y *Bradypus* spp. (Bradypodidae) y a los roedores *Otodylomys phyllotis* (Merriam), *Neotoma micropus* (Baird) (Cricetidae), *Proechimys* spp. (Echimyidae) y *Cuniculus paca* (Linnaeus) (Muridae).

En estudios puntuales se ha aislado *Leishmania* sp. y discutido en algunos casos el papel como reservorio o reservorio potencial en *Otodylomys phyllotis* (Wynsberghe et al, 2000), *Sigmodon hispidus* (Say y Ord) (Muridae), *Rattus rattus* (Oliveira et al, 2005; De Lima et al, 2002; Brandao et al, 2003), *Neotoma micropus* (Raymond et al, 2003), *Thrichomys apereoides* (Lund) (Echimyidae) (Oliveira et al, 2005), *Nectomys squamipes* (Brants) (Muridae), *Bolomys lasiurus* (Lund) (Muridae), *Holochilus sciureus* (Wagner) (Muridae), *Akodon cursor* (Winger) (Muridae), *Marmosa* sp. (Gray) (Didelphidae), *Didelphis albiventris* (Lund) (Didelphidae) (Schallig et al, 2007; Brandao et al, 2003), *Choloepus hoffmanni* (González et al, 2015).



Grimaldi y Tesh (1993), completan esta lista de reservorios probables o sospechosos de *L. braziliensis* con roedores de los géneros *Oryzomys*, *Rhipidomys* (Muridae) y *Proechimys* (Echimyidae), además de mencionar a edentados, marsupiales, equinos y al perro doméstico. Sin embargo, el papel de estos últimos en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis cutánea aun no es claro. Silva y col (2005), sugieren que tanto perros, caballos y mulas podrían ser reservorios secundarios, pero el desarrollo de las lesiones en estos animales sugiere que ellos son hospedadores accidentales, al igual que el humano.

La evidencia obtenida hasta el momento del rol de los perros como reservorios de leishmaniasis tegumentaria es circunstancial y estos no han demostrado tener capacidad para actuar como reservorio funcional (Reithinger y Davies, 1999, Padilla et al, 2002, Marco et al, 2005), al igual que el ser humano y se requieren investigaciones mas amplias y precisas para involucrarlo (Reithinger y Davies, 1999, Fernández, 2012).

Algunas especies de flebotominos son especie-específicas con la especie de vertebrado de la que realizan la ingesta de sangre, aunque usualmente son más generalistas, pudiendo ingerir sangre de varias especies de mamíferos (Sherlock et al, 2003). Por ello el radio de vuelo, en ambientes domésticos y peridomésticos, está condicionado por la oferta y distribución de fuentes de alimento (WHO, 2010). Entre otros estímulos que atraen a los flebotomos hasta su hospedador, se ha descrito a la temperatura y al olor corporal (Sherlock et al, 2003). A diferencia de otros nematócera hematofagos, tanto machos como hembras son atraídos al hospedador vertebrado, generalmente llegando los machos primero y atrayendo a las hembras con las que copulan luego que estas se alimentan (Fernández, 2012).

Hasta hace poco, la identificación de ingesta sanguínea en flebotominos se había limitado a estudios serológicos utilizando ELISA (Gómez et al, 1998, Agrela et al, 2002, Bongiorno et al, 2003, Svobodová et al, 2003, Marassa et al, 2006 y Rossi et al, 2008), contra-inmunolectroforesis (Morsy y col, 1993), la difusión en gel de agarosa (Srinivasan y Panicker, 1992), la prueba de precipitación (Tesh y col, 1971, Tesh et al,

1972 , Javadian et al , 1977, Morrison et al, 1993, Nery et al, 2004 y Afonso et al, 2005) y una técnica histológica más laborioso (Guzmán et al, 1994) El primer método basado en la PCR usando el gen prepronociceptin fue descrito por Haouas et al, (2007) Aunque estos métodos han proporcionado información importante sobre la identidad de los huéspedes vertebrados de muchos artrópodos que se alimentan de sangre, toman mucho tiempo y carecen de sensibilidad

La identificación basada en PCR de las ingestas de sangre del huésped vertebrado es una alternativa potencialmente conveniente, que ya ha sido realizado en varios vectores incluyendo garrapatas (Pichon et al , 2003 y Estrada-Peña et al , 2005), triatomíneos (Bosseno et al 2006 y Pizarro et al , 2007) y mosquitos La PCR basado en cebadores diseñados a partir de alineamientos múltiples del gen citocromo b mitocondrial han identificado anfitriones de mamíferos y aves de diversas especies de mosquitos (ONG y Kramer, 2003, Kent y Norris, 2005, Molaei et al, 2006, Kent et al , 2006) También se utilizó el análisis de PCR-RFLP del citocromo b, para identificar el origen de ingestas de sangre en la garrapata *Ixodes ricinus* (Kirstein y Gray, 1996) y la mosca *tsé-tsé* (Steuber et al , 2005)

Sin embargo, la conservación de muestras en condiciones de campo, junto con la necesidad de un método rápido y sensible para identificar los hospederos de los flebotomíneos es importante para el estudio de asociaciones de vectores con los vertebrados, así como para mejorar las intervenciones actuales de control vectorial (Sant'Anna et al, 2008), ya que muchas veces las estrategias de control se basan en prevenir la transmisión desde el reservorio en lugar de interrumpirla desde el vector (Haydon et al, 2002)

## **2. HIPÓTESIS**

Las especies antropofílicas de *Lutzomyia* presentan una variación en la tasa de infección con parásitos del género *Leishmania* spp en el domicilio o en el peridomicilio, antes y después de realizar una intervención con insecticida, que puede estar asociada a una fuente alimenticia específica

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

Estudiar la prevalencia de infección por *Leishmania* spp y el tipo de ingesta sanguínea en las principales especies de *Lutzomyia* antropofílicas presentes en una comunidad rural endémica a Leishmaniasis Tegumentaria en la provincia de Panamá Oeste

### **3.2 Objetivos Específicos**

- (1) Determinar la composición y abundancia de las especies antropofílicas del género *Lutzomyia* en el domicilio y peridomicilio de las viviendas antes y después de una intervención con insecticida en la comunidad de Trinidad de las Minas, en Capira
- (2) Identificar mediante el espaciador transcrito interno (PCR ITS-1) la infección por *Leishmania* spp y la tasa de prevalencia de infección, en las principales especies antropofílicas del género *Lutzomyia* presentes en el domicilio y peridomicilio de las viviendas
- (3) Establecer el tipo de ingesta sanguínea en las principales especies antropofílicas del género *Lutzomyia* presentes en el domicilio y peridomicilio de las viviendas, utilizando el marcador Citocromo b (Cyt b) de vertebrados

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Área de Estudio

La Comunidad Trinidad de las Minas ( $8^{\circ}46'32''\text{N}$ ;  $79^{\circ}59'45''\text{W}$ ), ubicada en el Distrito de Capira, en la Provincia de Panamá Oeste (Fig. 8), presenta un clima con una estación seca (diciembre a marzo) y una lluviosa (abril a noviembre), la temperatura media es de  $26^{\circ}\text{C}$  todo el año y la precipitación puede variar entre 28 a  $570\text{ mm}^3$  por mes (Calzada et al, 2013).

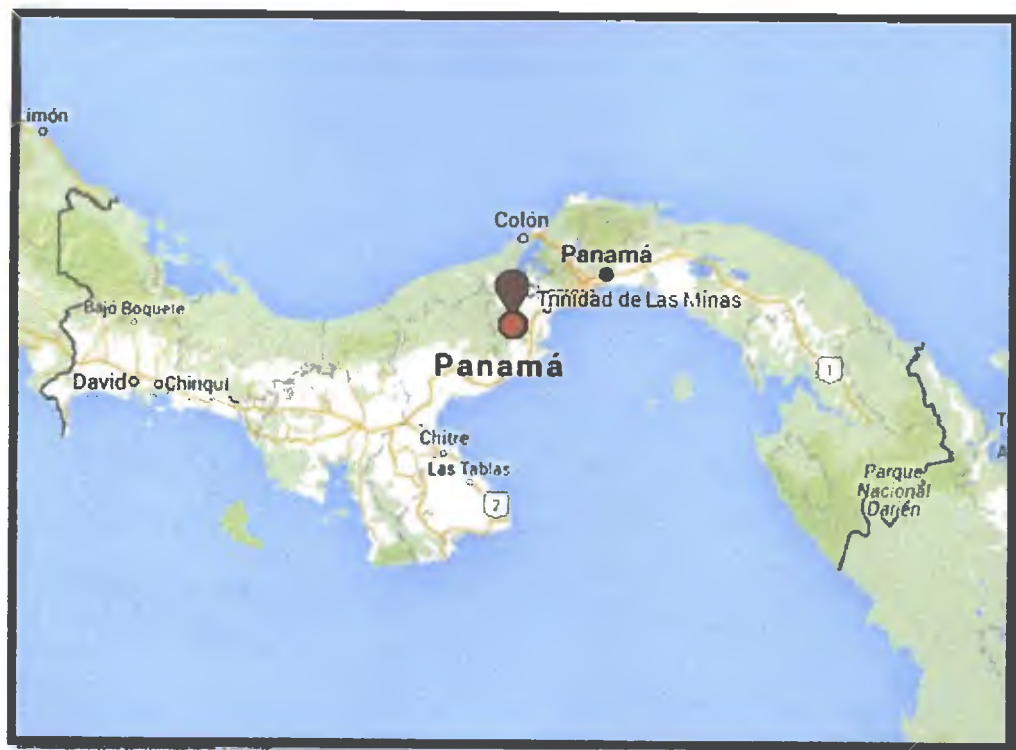


Fig. 8: Ubicación geográfica de la Comunidad de Trinidad de las Minas, Distrito de Capira, Panamá (Fuente: Googlemaps, 2016).

Esta zona es ecológicamente clasificada como bosque húmedo tropical de tierras bajas (Fig. 9). Durante los últimos años la vegetación nativa regional ha sido destruida, principalmente para el desarrollo agrícola y el bosque se ha convertido en zona de transición, con algunas especies xerófilas de hojas caducifolias (Calzada et al, 2013; Chaves et al, 2013).



Fig. 9: Características de la vegetación de la comunidad de Trinidad de las minas, constituido por un bosque húmedo tropical.

Se escogió esta comunidad, Trinidad de las Minas, en el Distrito de Capira, por ser un foco de transmisión endémica de LC (Fig.10). En esta área, el incremento de los casos oscila entre 137 a 508 por año, con una incidencia que corresponde al 20% de todo el país (Valderrama, 2012). Se realizó durante el estudio dos intervenciones con termonebulizaciones con insecticida Deltametrina en el domicilio y peridomicilio (Junio 2010 y Enero 2011), porque no se había realizado anteriormente ninguna actividad de control vectorial en esa comunidad (Fig. 11).



Fig. 10: Características de las viviendas encontradas en la comunidad de Trinidad de las minas, foco de transmisión de LCA.



Fig. 11: Aplicación de termonebulización con Deltametrina en las viviendas durante el estudio.

#### 4.2 Colecta de los Especímenes

Los especímenes fueron colectados durante los meses de Abril 2010 a Junio de 2011, se colocaron Trampas de Luz HP con baterías (trampa para flebotomíneos HP Equipamientos e Instrumentos Biomédicos Industria y Comercio LTDA, Brasil), dentro de la vivienda en el dormitorio principal (domicilio) y alrededor de la vivienda a una distancia no mayor de 10 mts (peridomicilio) de 24 viviendas escogidas al azar, durante 12 horas (6 00 pm a 6 00 am) (Fig 12 y 13) Los especímenes colectados se preservaron en envases plásticos con etanol 70% previamente etiquetados, para ser transportados al laboratorio del ICGES donde fueron identificados de acuerdo a sus características morfológicas empleando las claves taxonómicas de Young y Duncan (1994) y se mantuvieron a - 4°C hasta su procesamiento de extracción



Fig 12 Trampas de luz HP, colocadas dentro de la vivienda (domicilio) y afuera (peridomicilio)



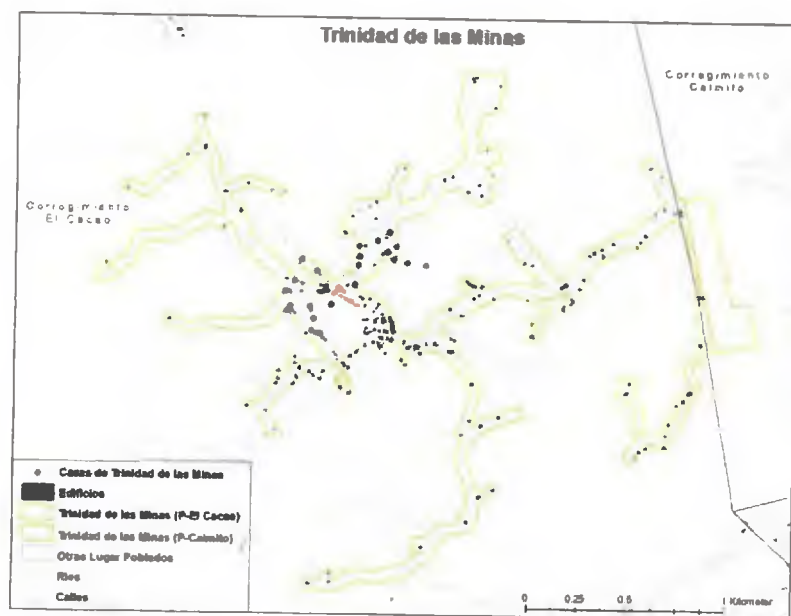


Fig. 13: Ubicación geográfica de las viviendas donde se realizaron las colectas de chitras en el domicilio y peridomicilio durante los meses del estudio Abril 2010-Jun 2011.

#### 4.3 Extracción de ADN de pools de *Lutzomyia* spp.

Una vez obtenida la composición de especies de *Lutzomyia* de las casas muestreadas, se seleccionaron aquellas que serían almacenadas para la búsqueda de infección natural con *Leishmania* por PCR, de acuerdo con tres criterios: sus antecedentes como vector, su antropofilia y su abundancia en el intra y peridomicilio.

Una vez identificadas y separadas las especies antropofílicas, se procedió a iniciar la extracción de ADN de las hembras de las 3 especies más abundantes (*Lutzomyia gomezi*, *Lu. panamensis* y *Lu. trapidoi*), siguiendo el Protocolo DNA Extraction from Pooled Mosquito de Laney (2007), utilizando el Kit de QIAgen DNeasy Blood & Tissue.

Las hembras fueron transferidas en grupos de 5-10 individuos (pool) por especie, en microtubos de 2 ml, donde se maceraron en una solución de 180 µl de PBS 1X, solución acuosa de lisis de 20 µl de Qiagen Proteinase K (PK) y 200 µl de Buffer AL (Kit QIAgen DNeasy), se incubaron las muestras a 70°C por 10 minutos y luego a 56°C por 1 hora, se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un columna de DNeasy con 200 µl de Etanol 95%, luego fueron centrifugadas a 8,000 xg por 1 minuto, se agregó 500 µl de Buffer AW1, se centrifugó a 8,000 xg por un minuto, se agregó 500 µl de Buffer AW2, se



centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos, al finalizar se transfirió el contenido a un microtubo de 1.5 ml para resuspender el ADN extraído del pool, agregando una solución de 250 µl de Elution Buffer AE y las muestras fueron almacenadas a -20°C

#### 4.4 Amplificación por PCR ITS-1 para detectar la Infección por *Leishmania* spp.

Para la detección de *Leishmania* spp se utilizó un PCR que amplifica el espaciador de transcripción interna 1 (ITS-1), una región no codificante situada en el gen SSU rRNA, delimitada por los genes 18S y 5.8S. Una cepa de referencia (2306) de *Le. panamensis*, fue utilizada como control para estandarizar el tamaño de bandas del producto (300-350 pb) que se debe obtener con los primers y así verificar la positividad (+) de los pools de flebótomos antropofílicos.

Este PCR detecta las diferentes especies de *Leishmania* utilizando la región ITS-1 sobre el ADN extraído, debido a los altos niveles de variación inter e intra que se han observado en especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo en el ADN de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2).

Para el análisis, las muestras fueron tamizadas usando los iniciadores (Marca IDT) descritos en el cuadro 1 (Cupolillo et al, 2009).

**Cuadro 1: Descripción de los Primer utilizados en el PCR ITS-1**

Primer	Concentración del primer	Tamaño del producto (pb)	Secuencia del Primer
LITSR	10 pmol/µl	300-350 pb	5'CTGGATCATTTTCCGATG3
LS 8S	10 pmol/µl	300-350 pb	5'TGATACCACTTATCGCACTT3'

Las amplificaciones por PCR se realizaron en 25 µl de una solución que contenía 12.5 µl de PCR Master Mix 2x de Promega (incluye 50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa suministrado en un buffer de reacción patentada (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP,

400 $\mu$ M dCTP, 400 $\mu$ M dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>), 1 25  $\mu$ l primer LITSR 10  $\mu$ M, 1 25  $\mu$ l primer L5 8S 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ l de agua destilada esteril y 5  $\mu$ l de plantilla de ADN extraído

La amplificación por PCR ITS-1 se realizó en un Termociclador Applied Biosystem con las siguientes condiciones de amplificación un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5min, seguido de 33 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20s, hibridación a 53°C durante 30s y extensión a 72 °C durante 1 min, y un ciclo de extensión a 72 °C durante 6 min Se utilizó como control positivo DNA de *Le (Viannia) panamensis* (cepa de referencia) y agua como control negativo

Los productos de amplificación se analizaron por Electroforesis en Gel de Agarosa al 1 5%, utilizando TBE 0 5X como buffer de corrida, teñida con 1 5  $\mu$ l de Bromuro de Etidio La Electroforesis se llevo a cabo a 85 voltios por una hora, utilizando un marcador de ADN de Peso Molecular de 100 pares de bases (Promega) y los productos fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP BioDoc-It System)

#### **4.5 Amplificación por PCR Multiplex del Gen Cyt b del ADN mitocondrial para determinar la Ingesta Sanguínea.**

Se utilizaron las muestras de ADN positivas para el PCR ITS-1 (grupos de flebotominos infectados) para discriminar el tipo ingesta de sangre presente Las muestras fueron tamizadas usando los iniciadores o cebadores (Marca Eurofins MWG Operon) de PCR para la amplificación de la región del gen Citocromo b (Cyt b) del ADN mitocondrial (ADNmt), de las especies de mamíferos utilizando el protocolo descrito por Kent y Norris (2005) Esta técnica de PCR Multiplex produce fragmentos de diferentes tamaños amplificados a partir de especies - específicos del gen del citocromo b, para diferenciar entre un selecto grupo de mamíferos como potenciales reservorios sanguíneos usando el ADN genómico extraído de los flebotominos La sangre ingerida se identificara utilizando los siguientes cebadores o primer descritos en el cuadro 2

**Cuadro 2: Descripción de los Primer utilizados en el PCR Multiplex**

<b>Primer</b>	<b>Concentración del primer</b>	<b>Tamaño del producto (pb)</b>	<b>Secuencia del Primer</b>
UnRev 1025	50 pmol/μl	623 pb	5 GGTTG[T/G]CCTCCAATTCATGTTA3
Pig 573F	50 pmol/μl	453 pb	5 CCTCGCAGCCGTACATCTC3
Human 741F	50 pmol/μl	334 pb	5 GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT3'
Goat 894F	50 pmol/μl	132 pb	5'CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCTC3
Dog 368F	50 pmol/μl	680 pb	5 GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT3'
Cow 121F	50 pmol/μl	561 pb	5 CATCGGCACAAATTTAGTCG3

Las amplificaciones por PCR se realizaron con 25 μl de una solución que contenía 12.5 μl de PCR Master Mix 2x de Promega (incluye 50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa suministrado en un buffer de (pH 8.5), 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 μl UNREV1025 50 μM, 0.5 μl Pig 573F 50 μM, 0.5 μl Human 741F 50 μM, 0.5 μl Goat 894F 50 μM, 0.5 μl Dog 368F 50 μM, 0.5 μl Cow 121F 50 μM, 6.5 μl de agua destilada estéril y 3 μl de plantilla de ADN extraído

Las muestras se incubaron con un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, hibridación a 56°C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min, y un ciclo de extensión a 72 °C durante 7 min

Los productos de amplificación se analizaron por Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.5%, utilizando TBE 0.5X como buffer de corrida, teñida con 1.5 μl de Bromuro de Etidio La Electroforesis se llevo a cabo a 85 voltios por una hora, utilizando un marcador de ADN de Peso Molecular de 100 pares de bases (Promega) y los productos fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP BioDoc-It System)

Para las muestras que no presentaron una reacción positiva con la PCR multiplex, se les realizó otro análisis de PCR utilizando el protocolo de Fornadel y Norris (2008), que

permite la identificación de la fuente de sangre a partir de extracciones de ADN parcialmente degradadas. La sangre ingerida se identificó utilizando los cebadores o primer universales de mamíferos en general y de aves en general (Marca Eurofins MWG Operon) descritos en el cuadro 3.

**Cuadro 3: Descripción de los Primer utilizados en el PCR de Mamífero y Aves en General**

Primer	Concentración del primer	Tamaño del producto (pb)	Secuencia del Primer
UnRev 1025	50 pmol/ $\mu$ l	623 pb	5'GGTTG[T/G]CCTCCAATTCATGTTA3'
UnFor 403	50 pmol/ $\mu$ l	623 pb	5'TGAGGACAAATATCATTCTGAGG3
Galliforme F	50 pmol/ $\mu$ l	300 pb	5'ATTTCGGCTCCCTATTAGCAG3
Galliforme R	50 pmol/ $\mu$ l	300 pb	5 GTCCGATGTGAAGAGATGAAGAAGAA3'

Las amplificaciones para el PCR de mamífero en general, se realizaron en 25  $\mu$ l de una solución que contenía 12.5  $\mu$ l de PCR Master Mix 2x de Promega (incluye 50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa suministrado en un buffer de reacción patentada (pH 8.5), 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5  $\mu$ l UNREV1025 de 50  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ l UNFOR403 de 50  $\mu$ M, 9.4  $\mu$ l de agua destilada estéril y 2  $\mu$ l de plantilla de ADN extraído. Las condiciones del PCR fueron un ciclo de 95 °C durante 5 min, seguido de 36 ciclos a 95 °C durante 1 min, 58 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min, y un ciclo final de 72 °C por 7 min y 4°C hold.

Las amplificaciones para el PCR de aves en general, se realizaron en 25  $\mu$ l de una solución que contenía 12.5  $\mu$ l de PCR Master Mix 2x de Promega (incluye 50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa suministrado en un buffer de reacción patentada (pH 8.5), 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5  $\mu$ l Gallif de 50  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ l GalliR de 50  $\mu$ M, 9.4  $\mu$ l de agua destilada estéril y 2  $\mu$ l de plantilla de ADN extraído. Las condiciones del PCR fueron un ciclo de 94°C durante 1min, seguido de 36 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo final de 72°C por 7min y 4°C hold.

Los productos de amplificación fueron analizados por Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.5%, utilizando TBE 0.5X como buffer de corrida, teñida con 1.5 µl de Bromuro de Etidio. La Electroforesis se llevó a cabo a 85 voltios por una hora, utilizando un marcador de ADN de Peso Molecular de 100 pares de bases (Promega) y los productos fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP BioDoc-It System).

#### 4.6 Análisis de los Datos

La abundancia relativa de las especies antropofílicas, se calculó como la proporción de la abundancia total de individuos correspondiente a cada especie y se empleó un análisis de correspondencia simple para medir la asociación de las especies antropofílicas con el domicilio y peridomicilio antes y después de una termonebulización con insecticida. Se eligió este método dada su capacidad para medir la asociación entre los datos categóricos: las especies antropofílicas (taxones), que se organizaron en columnas, formando una tabla donde las filas son los diferentes ambientes (Intradomicilio y Peridomicilio) antes y después de una intervención, cuya asociación entre las filas y columnas se quiere estudiar; este análisis se realizó con el Software Past versión 2.17c.

La Prevalencia de infección por *Leishmania* spp para las especies de *Lutzomyia* dominantes en nuestro sitio de estudio, se estimó para pool recogidos antes y después de las aplicaciones de termonebulización con insecticida. Se empleó el método de estimación de máxima verosimilitud desarrollado para el tamaño de pool desigual por Farrington et al (1992), que encaja fácilmente con los modelos lineales generalizados, con intervalos de confianza estimados invirtiendo la prueba de razón de verosimilitud (Speybroeck et al, 2012). Se empleó este método suponiendo que la sensibilidad y especificidad de la prueba de diagnóstico de *Leishmania* fueron casi 1, dado que nuestro PCR de diagnóstico es un estándar de oro (gold standard) común para determinar infecciones de *Leishmania* spp (Miranda et al 2009).

La asociación entre las fuentes de sangre, la infección por *Leishmania* spp, la ubicación de la trampa (peridomicilio o domicilio), estado de la intervención (casas intervenidas o

control), el tiempo de recogida con respecto a la nebulización (pre-intervención, primera ronda de nebulización o segunda ronda de nebulización) se analizó mediante un análisis de correspondencia múltiple (Venables y Ripley, 2002) Se eligió este método dada su capacidad para medir la asociación entre las variables categóricas Debido a que la información de cada uno de los objetos de estudio, los pool de chitras, se organizó en filas formando una tabla donde las columnas son los diferentes factores cuya asociación se quiere estudiar, estos análisis se realizaron con el software Estadístico R versión 2.0.14

#### **4.7 Aspectos Éticos**

Los habitantes de las viviendas donde se instalaron las trampas de luz HP fueron informados del objetivo del estudio y dieron su consentimiento firmado Todos los procedimientos llevados a cabo durante el estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (561 /CNBI/ICGES/06)

## 5. RESULTADOS

### 5. 1 Composición y abundancia de las especies antropofílicas del género *Lutzomyia* en el domicilio y peridomicilio de las viviendas antes y después de la intervención con insecticida.

En las 24 viviendas de la comunidad de Trinidad de las Minas, se colectaron durante un año 5,628 individuos de la subfamilia Phlebotominae, 2,357 en el intradomicilio y 3,271 en el peridomicilio

Un total de 5,623 individuos pertenecen al género *Lutzomyia* França (1924) y 5 individuos al género de *Brumptomyia* França y Parrot (1921) Se lograron identificar 23 especies de *Lutzomyia* França (1924) en esta comunidad *Lu aclydifea* (Fairchild y Hertig, 1952), *Lu camposi* (Rodríguez, 1952), *Lu carpenteri* (Fairchild y Hertig, 1953), *Lu carrerai thula* (Young, 1979), *Lu cruciata* (Coquillett, 1907), *Lu dysponeta* (Fairchild y Hertig, 1952), *Lu furcata* (Mangabeira, 1941), *Lu gomezi* (Nitzulescu, 1931), *Lu gorbitzi* (Blancas, 1959), *Lu nordestina* (Mangabeira, 1942), *Lu olmeca bicolor* (Fairchild y Theodor, 1971), *Lu ovallesi* (Ortiz, 1952), *Lu panamensis* (Shannon, 1926), *Lu punctigeniculata* (Floch y Abonnenc, 1944), *Lu sanguinaria* (Fairchild y Hertig, 1957), *Lu serrana* (Damasceno y Arouck, 1949), *Lu shannoni* (Dyar, 1929), *Lu trapidoi* (Fairchild y Hertig, 1952), *Lu trinidadensis* (Newstead, 1922), *Lu triramula* (Fairchild y Hertig, 1952), *Lu vesicifera* (Fairchild & Hertig, 1947), *Lu vespertilionis* (Fairchild y Hertig, 1947), *Lu ylephiletor* (Fairchild y Hertig, 1952), y *B hamata* (Fairchild y Hertig, 1947)

Los resultados indican que en la composición de las especies de importancia médica en esta comunidad, predominan 6 especies antropofílicas previamente incriminadas en la transmisión de la Leishmaniasis cutánea en Panamá *Lu trapidoi*, *Lu gomezi*, *Lu panamensis*, *Lu ylephiletor*, *Lu sanguinaria* y *Lu carrerai thula* (Cuadro 4)

**Tabla 1: Composición y Abundancia Relativa de las especies antropofílicas colectadas en las viviendas de la comunidad de Trinidad de las Minas antes y después de una intervención química**

<b>Especies</b> <b>Antropofílicas</b>	<b>PRE</b>		<b>POST</b>		<b>n</b> <b>%</b>
	<b>Intradomicilio</b>	<b>Peridomicilio</b>	<b>Intradomicilio</b>	<b>Peridomicilio</b>	
<i>Lu trapidoi</i>	13	22	777	339	35
<i>Lu gomezi</i>	190	306	549	101	35
<i>Lu panamensis</i>	99	418	88	362	29
<i>Lu carrerai thula</i>	0	3	1	5	0.27
<i>Lu ylephiletor</i>	0	0	2	13	0.45
<i>Lu sanguinaria</i>	1	0	7	2	0.3
<b>TOTAL</b>	<b>303</b>	<b>749</b>	<b>1424</b>	<b>822</b>	

Se destacan *Lu trapidoi* (35%), *Lu gomezi* (35%) y *Lu panamensis* (29%) por la abundancia relativamente alta, cercana al 99% de las especies antropofílicas colectadas y su presencia en la mayoría de las viviendas muestreadas. Las demás especies antropofílicas se presentaron con abundancias bajas, inferiores al 1% en las viviendas muestreadas.

El Análisis de Correspondencia Simple (ACS), muestra que antes de realizar una intervención química con insecticida, *Lu gomezi* estaba asociada al intradomicilio y *Lu panamensis* con el peridomicilio antes de realizar la intervención. Posteriormente, luego de realizar las intervenciones, se asocia a *Lu trapidoi* y *Lu gomezi* al intradomicilio, mientras que *Lu panamensis* mantuvo su presencia en el peridomicilio (Fig. 14).

El análisis muestra que las especies con abundancias bajas, *Lu carrerai thula* y *Lu ylephiletor*, estaban asociadas al peridomicilio antes y después de la intervención. Mientras que *Lu sanguinaria*, estaba muy asociada al intradomicilio después de la intervención.



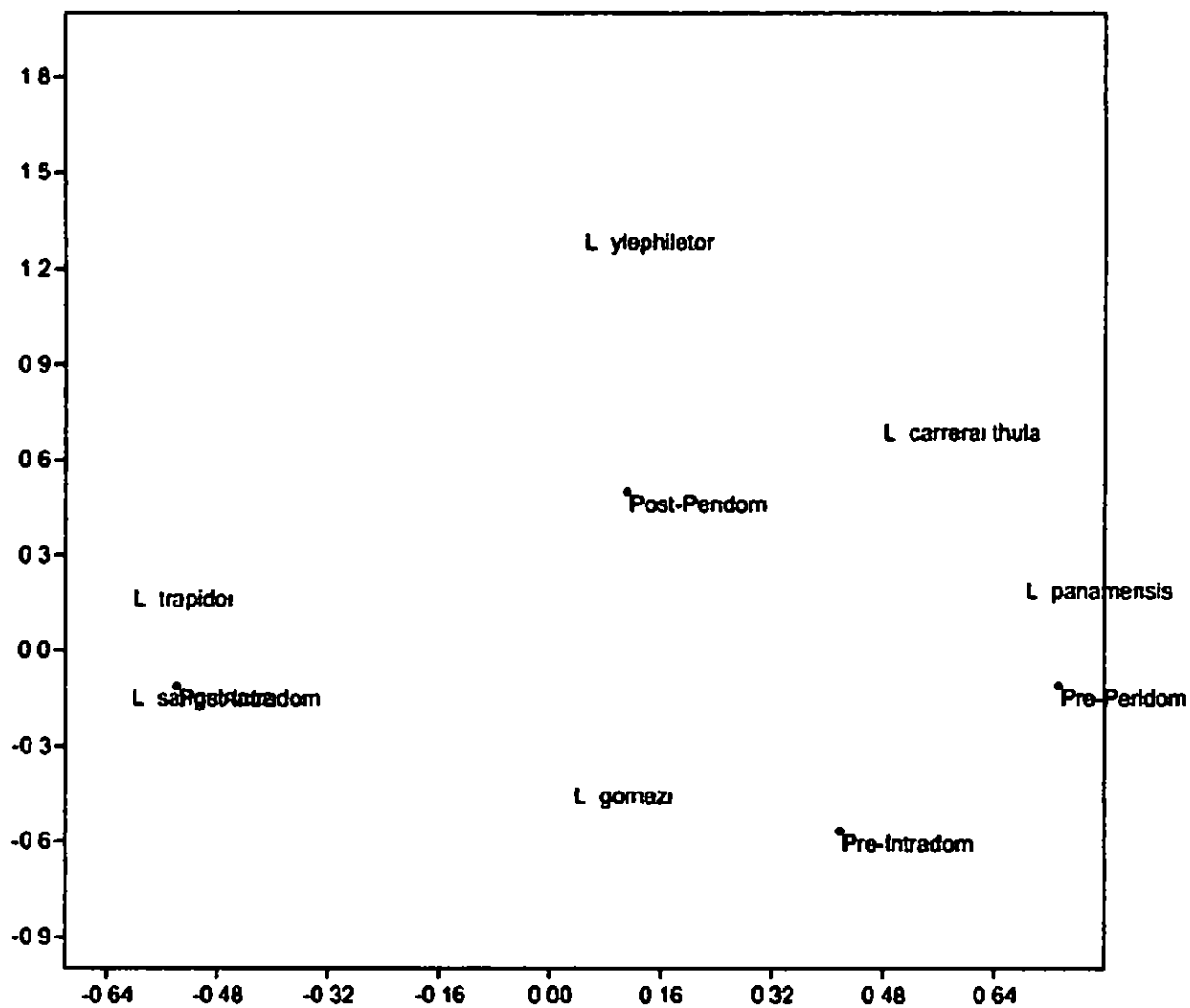


Fig 14 Análisis de Correspondencia Simple (ACS), de las especie antropofilicas asociadas al ambiente del intradomicilio y peridomicilio antes (Pre) y despues (Post) de una intervención con insecticida.

## 5.2 Prevalencia de infección con *Leishmania* spp. mediante el PCR ITS-1

De los 455 pools de *Lutzomyia* analizados mediante PCR ITS-1 con iniciadores específicos, se obtuvieron 164 pool positivos que correspondían a las especies más abundantes de flebotominos antropofílicos de LC en la comunidad *Lutzomyia trapidoi*, *Lu gomezi* y *Lu panamensis* y adicional 89 pool positivos para las dos especies zoofílicas más abundantes *Lu triramula* y *Lu dysponeta* (Fig 15) Anexos (Fig 24 y 25)

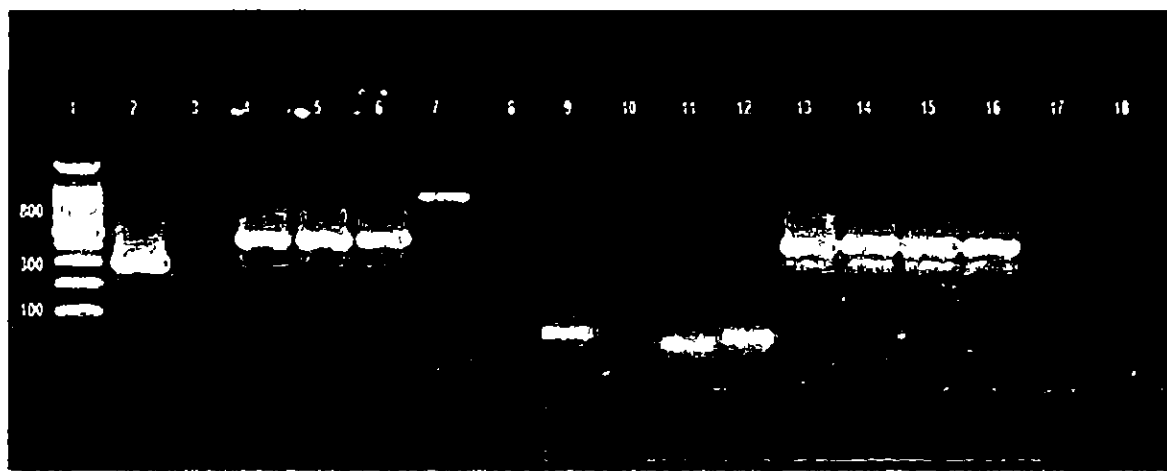


Fig. 15 Electroforesis de los productos amplificados mediante PCR ITS-1 para detectar infección por *Leishmania* spp. carril 1 marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 2 Control positivo de *Le panamensis*, carril 4 pool de *Lu gomezi*, carril 5 y 6 pool de *Lu trapidoi*, carril 7 pool de *Lu triramula*, carril 13 pool de *Lu panamensis*, carril 14, 15 y 16 pool de *Lu trapidoi*, carril 18 Control negativo

Se estimó la prevalencia de infección por *Leishmania* spp y otros tripanosomátidos a través de un análisis de máxima verosimilitud, con intervalos de confianza del 95% (IC), a partir de pools de tamaño variable (Tabla 1), la última columna indica que no hubo cambios significativos (NS) en la prevalencia de la infección antes (Pre) y después (Post) de la nebulización en las poblaciones de *Lu gomezi*, *Lu panamensis* y *Lu dysponeta*, pero si hubo una disminución en la prevalencia de infección después (Post) de la nebulización en la especie de *Lu trapidoi* Y también se observó un aumento de la prevalencia de infección después de la nebulización en los pools de *Lu triramula*

**Tabla 2. Prevalencia de infección por *Leishmania* spp. y otros tripanosomátidos. en pools de *Lutzomyia* antes y después de la aplicación de dos rondas con termonebulización con insecticida deltametrina [6 mg a.i.m<sup>-2</sup>] en Trinidad de Las Minas, Panama**

Especies	Pre-nebulización			Post-Nebulización			Cambios
	Prevalencia [95% CI]	Número de Pools	Número de SF	Prevalencia [95% CI]	Número de Pools	Número de SF	
<i>Lutzomyia gomezi</i> (Nitzulescu)	0.022 [0.010- 0.040]	44	394	0.037 [0.020- 0.060]	59	405	NS
<i>Lutzomyia trapidoi</i> (Fauchild and Hertig)	0.189 [0.061 - 0.398]	9	28	0.033 [0.022- 0.047]	106	891	Disminuyó
<i>Lutzomyia panamensis</i> (Shannon)	0.012 [0.004- 0.025]	48	443	0.018 [0.007- 0.035]	53	408	NS
<i>Lutzomyia dysponeta</i> (Fauchild and Hertig)	0.057 [0.026- 0.104]	22	163	0.040 [0.007- 0.117]	18	51	NS
<i>Lutzomyia triramula</i> (Fauchild and Hertig)	0.023 [0.012 - 0.038]	65	608	0.193 [0.111- 0.304]	23	111	Aumentó
Total	0.025 [0.018- 0.034]	188	1636	0.038 [0.029- 0.047]	259	1866	NS

\* Estadísticamente significativo (P<0.05)

Por medio de un análisis de correspondencia múltiple (ACM) se evaluó la asociación entre especies de flebotominos, los resultados de la PCR, la presencia de sangre de vertebrados en los pools, el tiempo respecto con la intervención de nebulización, si la casa donde los pools de flebotominos fueron colectados se nebulizó, si las muestras eran del domicilio o peridomicilio. Estos resultados se pueden observar en la fig 16, en la misma se muestra que los pool de flebotominos con sangre eran mas propensos a ser positivo al PCR de *Leishmania* spp, y tienden a ocurrir más a menudo en las casas control que en las casas nebulizadas.

Las especies que eran más propensas a tener parásitos en sus pool fueron *Lu trapidoi* colectada dentro de las casas control después de la nebulización y *Lu triramula* colectada en el peridomicilio de las casas control antes de la nebulización. Por el contrario, los pool de *Lu gomezi*, *Lu dysponeta* y *Lu panamensis* tenían más probabilidades de estar libre de parásitos, no tener sangre, especialmente cuando se colectaba dentro y alrededor (peridomicilio) de las casas intervenidas.

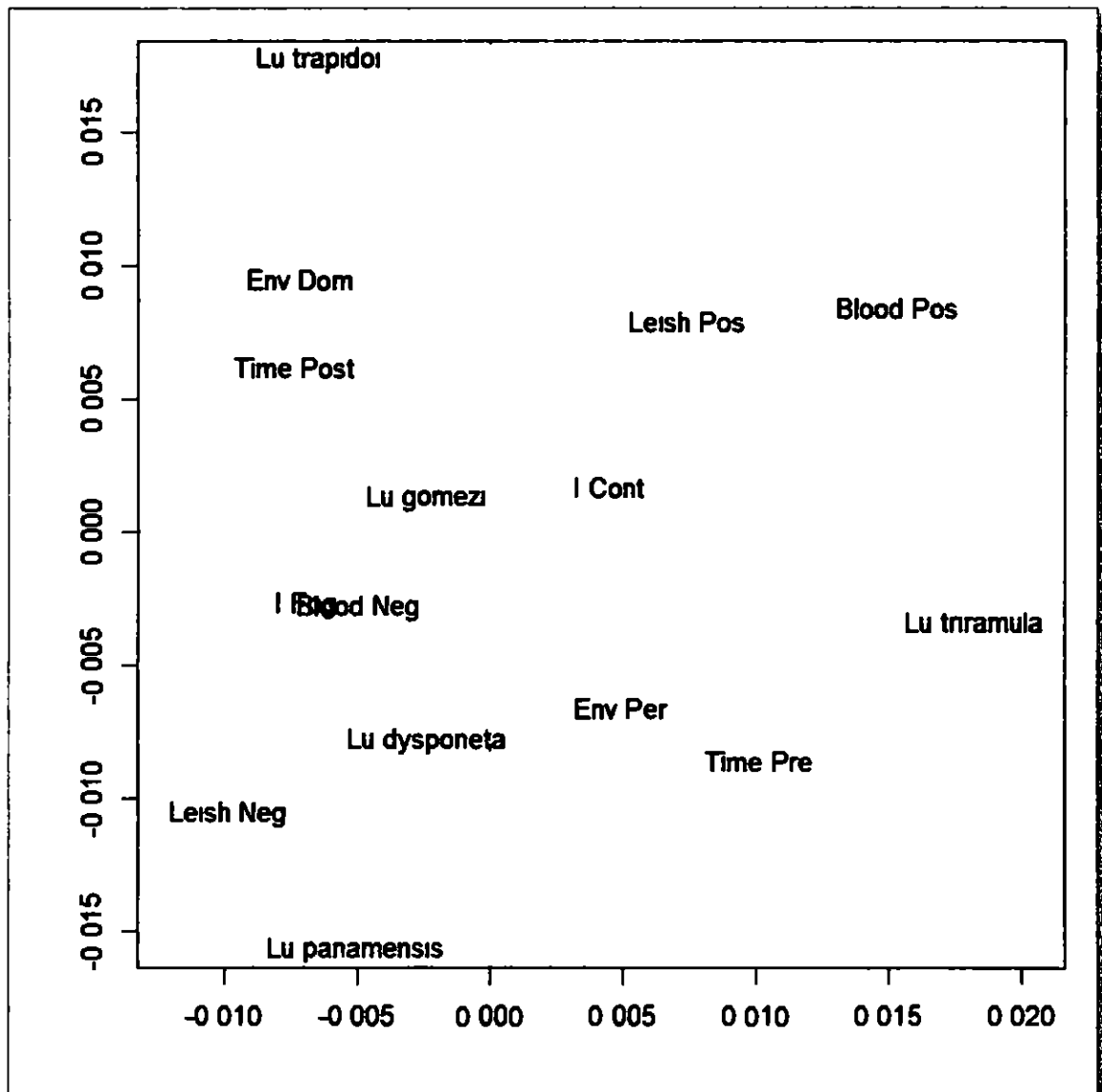


Fig 16 Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) considerando las especies de *Lutzomyia* (Lu), medio ambiente muestreado (Env, Per = peridomicilio, Dom = Domicilio), tiempo en relación con la nebulización (Pre= antes de la nebulización, Post= después de la nebulización), el estado de la Intervención de la casa focal (Cont = Control, Fog = nebulizada), PCR de diagnóstico de *Leishmania* spp (Leish, Pos = positivo, Neg = negativo), el contenido de sangre de cualquier especie de vertebrados (sangre, Pos = positiva, Neg = negativo) de los pool de *Lutzomyia* analizados

### 5.3 Tipos de Ingesta Sanguínea utilizando el marcador Citocromo B (Cyt b) de vertebrados.

En la detección de ingesta sanguínea mediante PCR Multiplex se observó que los pool positivos de *Lutzomyia*, todas las especies se alimentaban de aves y perros. Los pools de *Lu dysponeta* y *Lu triramula* no tenían sangre de humanos, mientras que las 3 especies antropofílicas más abundantes *Lu trapidoi*, *Lu gomezi* y *Lu panamensis*, se alimentaron de sangre humana (Tabla 2)

Además, se observó la capacidad de estas especies de alimentarse de una variedad de especies de hospederos y mostrar los perfiles de alimentación mezclados. *Lu trapidoi* (cerdo + humano + cabra/ Perro + humano), *Lu gomezi* (perro + vaca + cerdo/ cerdo + humano/vaca + cerdo/ perro + humano), *Lu panamensis* (perro + ave/ perro + cabra/ cerdo + cabra/ humano + cabra). Mientras que las especies zoofílicas *Lu triramula* (perro + cerdo/ vaca + cerdo/ cerdo + cabra/ ave + cabra) y *Lu dysponeta* no mostraron un perfil de alimentación mezclado (Anexo Fig 26-29)

**Tabla 3. Números de pools asociados a diferentes Fuentes Sanguíneas para cada especie de flebotomíinos**

Especies	Vertebrados	Perro	Vaca	Cerdo	Humano	Cabra	Ave
<i>Lutzomyia gomezi</i> (Nitzulescu)	34	7	6	14	4	0	10
<i>Lutzomyia trapidoi</i> (Fairchild and Hertig)	22	3	0	1	11	4	7
<i>Lutzomyia panamensis</i> (Shannon)	14	4	1	3	3	7	2
<i>Lutzomyia dysponeta</i> (Fairchild and Hertig)	11	1	0	0	0	8	2
<i>Lutzomyia triramula</i> (Fairchild and Hertig)	29	4	3	20	0	5	2
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>38</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>23</b>

El análisis de asociación entre las fuentes sanguíneas y la infección por *Leishmania* spp detectado por PCR (Multiplex e ITS-1), mediante un Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM), indicó que *Lu trapidoi* y *Lu triramula* fueron las especies más propensas a estar infectadas por parásitos, que sus pools estaban principalmente asociados a la ingesta de sangre de aves (*Lu trapidoi* y *Lu triramula*) y humanos (*Lu trapidoi*), mientras que los pools de *Lu gomezi* están asociados principalmente a la sangre de cerdo.

En la mayoría de los pools de *Lu panamensis* y *Lu Dysponeta*, la ingesta sanguínea estaba asociado a las cabras y eran más propensos a ser negativos al PCR de infección (Fig 17)

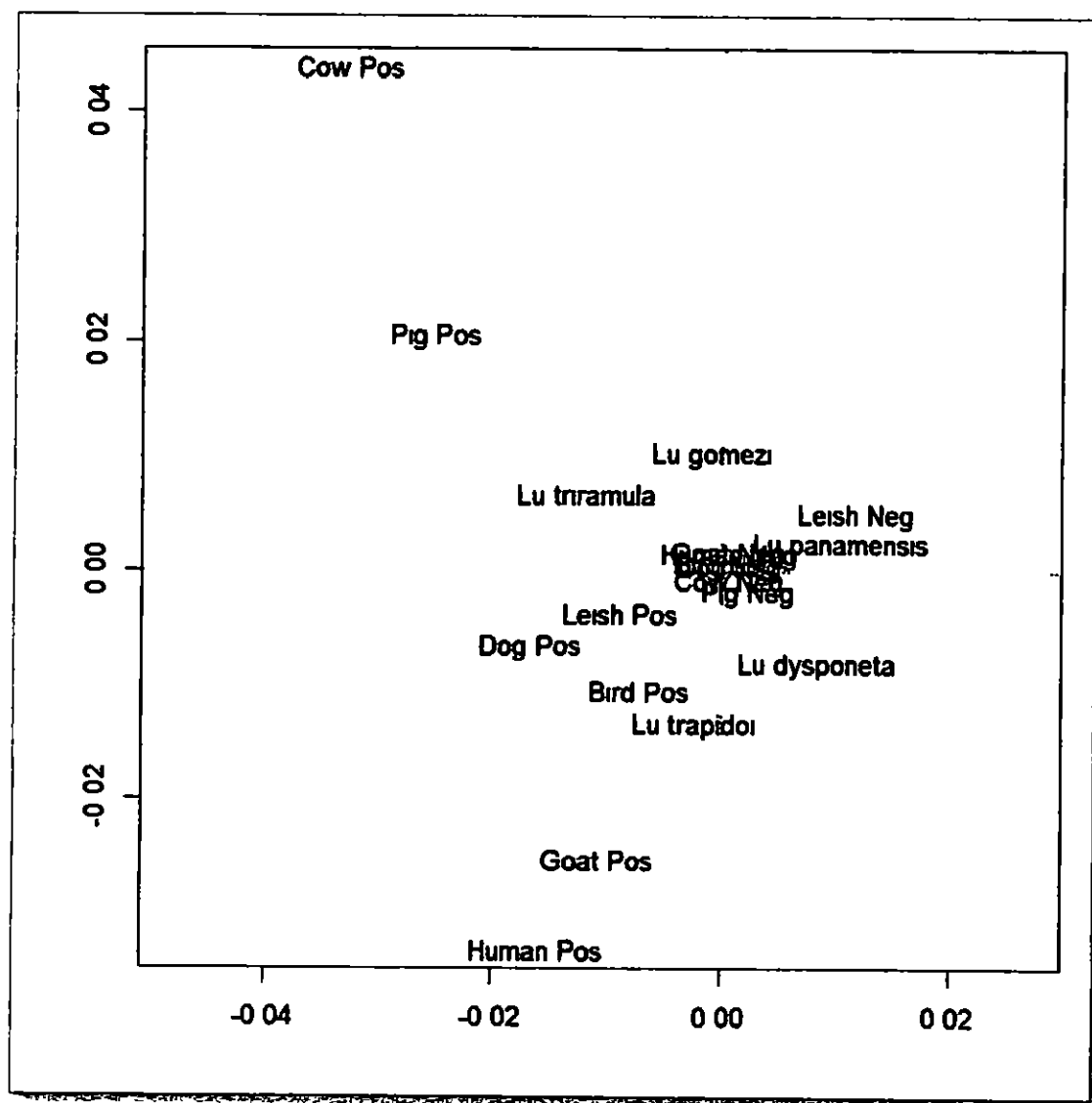


Fig 17 Análisis de Correspondencia Múltiple considerando las especies de *Lutzomyia* (Lu), PCR Diagnóstico de *Leishmania* spp (Leish) y la ingesta de sangre de los siguientes hospederos Humano, Vaca, Perro, cabra, Cerdo y aves de los pool de flebotomíneos analizados

## 6. DISCUSIÓN

La infección natural es uno de los criterios más importantes en la incriminación de una especie de *Lutzomyia* como vector de *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990) y es el que presenta mayor dificultad en su demostración (Young et al, 1987, Kreutzer et al, 1991). Actualmente, la PCR es una técnica de alta sensibilidad utilizada con frecuencia en los estudios epidemiológicos de leishmaniasis para la detección e identificación del parásito en pacientes, reservorios y vectores. Es con esta metodología como se ha logrado detectar la infección natural por *Leishmania* en varias poblaciones de flebótomos en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, México, Panamá, Perú y Venezuela (Pérez et al, 1994, Torres et al, 1998, Rodríguez et al, 2002, Jorquera et al, 2005, de Pita-Pereira et al, 2005, Córdoba et al, 2006, Paiva et al, 2006, Perruolo et al, 2006, Oliveira-Pereira et al, 2006, Santamaría et al, 2006, Cocheró et al, 2007, do Nascimento et al, 2007, Neitzke et al, 2008; Marcondes et al, 2009, Miranda et al, 2009, Sánchez-García et al, 2010, Kato et al, 2011, Valdivia et al, 2012, Vásquez Trujillo et al, 2013, Brito et al, 2014, Neitzke-Abreu et al, 2014, Moya et al, 2015, Pereira-Junior et al, 2015).

El presente estudio caracteriza un área hiperendémica de LC en Panamá, donde las especies antropofílicas *Lu trapidoi* y *Lu gomezi* fueron las más abundantes en el intradomicilio de la mayoría de las viviendas evaluadas, mientras que *Lu panamensis* lo fue en el peridomicilio. La especie *Lu trapidoi* fue la que más se capturó ingurgitada en el intradomicilio, indicando indirectamente su habilidad para alimentarse en el interior de las viviendas. Previamente se reportó el comportamiento de picada de esta especie en Limbo-Gamboa-Povincia de Panamá, utilizando cebo humano, determinando de esa manera su preferencia antropofílica (Tesh et al 1971).

Por otro lado se demostró en esta especie una alta prevalencia de la infección con *Leishmania* spp (0.189) y un decrecimiento de la infección al implementarse una intervención química en el momento de los brotes. En otro estudio realizado en Panamá, se ha determinado una alta prevalencia de infección por *Leishmania* (43.3) en especies de *Lu trapidoi* colectadas en ambiente boscosos (Azpurua et al 2010). Según Arias et al (1985), Miranda et al (2002) y Silva y Castellón (2012), en las zonas donde la LTA

presenta un comportamiento endémico en Panamá, las tasas de infección son bajas, oscilando alrededor de 0-3%, que sólo se encuentra en las zonas de bosques que han sido sometidas a la fragmentación, como el área de este estudio. Es importante señalar que las tasas de infección en los insectos, pueden variar en ciertos ambientes, independientemente de la presencia de los hospederos vertebrados infectados en el sitio (Young y Arias, 1992)

Anteriormente el estudio de Miranda et al (2009) había reportado la tasa general de infección natural con *Leishmania* en 103 pool de flebótomos de aproximadamente 0,46%. Siendo *Lu gomezi* y *Lu panamensis*, las especies predominantes incriminadas como vectores en las regiones de Gamboa (Distrito de Panamá), Altos de Campana (entre los Distritos de Capira y Chame) y Santa Clara (Distrito de Arraiján)

En el peridomicilio también se encontraron individuos de *Lu gomezi* y *Lu trapidoi*, sin embargo *Lu panamensis*, es la que prevalece con una mayor abundancia fuera de las viviendas. El poco contenido sanguíneo encontrado en estos especímenes, la baja prevalencia de infección y una alimentación variada, sugiere que su relación con la transmisión intradomiciliar necesita de estudios adicionales antes de ser aclarada.

Adicional de la invasión de los bosques, la presencia de animales domésticos y reservorios susceptibles, que han favorecido la ecología de la enfermedad en los ecosistemas humanos, contribuyendo a la aparición de brotes y epidemias de leishmaniasis (Hoyos-López et al, 2016). Estos aspectos favorecen la domesticación de las poblaciones de flebotomíneos compatibles con las especies de *Leishmania*, como ocurre con las especies de nuestro estudio que han demostrado su habilidad de adaptarse al ambiente domiciliar (*Lu trapidoi* y *Lu gomezi*) y peridomiciliar (*Lu panamensis*) para alimentarse.

Por otro lado, *Lu triramula* y *Lu dysponeta*, especies consideradas zoofílicas, fueron capturadas frecuentemente en el peridomicilio. Hasta el momento estas especies no han sido incriminadas en la transmisión de leishmaniasis en América. Sin embargo, debe



destacarse que algunos pools de ambas especies resultaron positivas (PCR-ITS) en nuestro estudio. El significado de este hallazgo en la ecoepidemiología de la LC en esta región del país debe ser investigado. *Lu triramula* se encuentra agrupada en el subgénero *Trichopygomyia*. Este subgénero se caracteriza por tener individuos que se ven atraídos por la luz (Young & Duncan 1994). La importancia médica del subgénero es desconocida debido a que las hembras no son antropofílicas. Hashiguchi et al (1992) capturaron miembros de *Trichopygomyia* utilizando cebo humano en un área hiperendémica a leishmaniasis en Paraguay. Sin embargo, hasta donde conocemos estas especies no han sido capturadas con cebo humano en ninguna región de Panamá (comunicación personal con el Sr. Roberto Rojas).

La observación de tamaños de la banda 500 a 900pb en el PCR de *Lu triramula* indica que podría estar amplificando otra especie de la familia Tripanosomatidae, debido a que el ITS-1 puede discriminar entre los grupos de *Leishmania* y de otros tripanosomatidos, en una muestra (Mahmoudzadeh-Niknam et al 2011) por lo que se debe considerar los componentes de la microbiota del estómago de los flebotomíneos (Killick-Kendrick et al 1974).

Por lo que, se considera que el balance entre estas dos conductas alimentarias (antropofílicas y zoofílicas), debe jugar un papel importante en la dinámica de transmisión de las Leishmaniasis, al ser las especies zoofílicas las que introducen la *Leishmania* en los ambientes sinantrópicos, y luego las especies antropofílicas esparcen la infección a los humanos (Chaves y Afnez, 2004).

La detección de *Leishmania* en *Lu gomezi*, *Lu panamensis*, *Lu trapidoi* fueron realizadas en el pasado mediante la técnica de precipitación de pectina, en la cual se determinó su infección natural, criterio importante para la incriminación de una especie como transmisor vector de LC (Killick-Kendrick, 1990). Actualmente, con marcadores moleculares más específicos y sensibles se ha logrado ampliar fragmentos parciales de regiones de genes, siendo de alta sensibilidad para los estudios epidemiológicos de LC y en la detección e identificación del parásito en pacientes, reservorios y vectores.

(Quaresma et al 2012) En este sentido, el análisis de la región ITS-1 nos permitio evaluar la infeccion natural antes y después de una intervencion con insecticidas, observándose un decrecimiento de individuos infectados De esta forma, se recomendaría que la forma de aplicación de insecticida durante los picos de abundancia es importante para disminuir el riesgo

*Lu trapidoi* es un vector confirmado de *Le (V) panamensis* en varios focos de transmisión de leishmaniasis cutánea en Colombia, Panama y Ecuador, en cuanto que *Lu gomezi*, es considerada como probable vector en varias regiones endémicas de leishmaniasis cutánea en Colombia (Bejarano et al 2002, Añez et al 2012, Gómez et al 2014) Ambas especies han sido relacionada en la transmisión *Le braziliensis* y *Le panamensis* en perros en Colombia (Vélez et al 2012) Referente a *Lu panamensis* presenta una amplia distribución, es antropofílica y vector comprobado de *Le (V) panamensis* en Panamá, también, ha sido incriminada en la transmisión de *Le (V) braziliensis* en Venezuela y encontrada con flagelados no identificados en Ecuador (Christensen et al 1983, Hashisushi et al 1985, Walter et al 1989, Jaramillo et al 1995)

De las demás especies encontradas se resaltan otras con antecedentes vectoriales (reportadas en Belice, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela) como *Lu olmeca bicolor* que esta implicada en la transmisión de parásitos del genero *Leishmania* en Latinoamérica (Grimaldi y Tesh, 1993, Maroli et al , 2012) *Lu ovallesi* que en Panama es señalada como vector sospechoso porque fue hallada infectada con flagelados no identificados (Christensen et al, 1983, Feliciangeli et al, 1988, Young y Duncan, 1994, Barrios et al, 1994, Cabrera et al, 1999, Nieves et al, 2004, 2012) y *Lu shannoni* es un vector comprobado de virus de la estomatitis vesicular y un presunto vector de la leishmaniasis visceral, se alimenta de mamíferos, incluyendo seres humanos, y se ha reportado que puede transmitir leishmaniasis visceral en perros, hamsters y otros mamíferos (Lawyer and Young 1987, Young y Duncan, 1994, Ferro et al 1998, Travi et al 2002, Schantz 2007), sin embargo, por su baja abundancia (menor al 5%) se descarta que estas especies puedan estar involucradas en la transmisión de la enfermedad en ambientes asociados al domicilio en nuestro estudio

Basándonos en su comportamiento alimenticio se puede dilucidar las implicaciones en la transmisión de patógenos al hombre y animales domésticos o silvestres (Palatnik-de-Sousa y Day, 2011) En la actualidad los estudios que evalúan el hábito alimenticio de insectos hematófagos mediante herramientas moleculares han mostrado ser muy eficientes para identificar la especie de la fuente alimenticia y posible reservorio (Ruiz, 2011)

Adaptamos la metodología de PCR para los mosquitos descritos por Kent y Norris (2005) y Ngo y Kramer (2003), para identificar las ingestas de sangre de las chitras colectadas en un área rural endémica a la transmisión de leishmaniasis. Esta metodología se desarrolló para la identificación del reservorio mediante la extracción de ADN usando pools de flebotomíinos para el posterior PCR. Nuestros resultados se comparan favorablemente con los descritos por Haouas et al (2007), donde extrajeron el ADN genómico de flebotomíinos utilizando un mini kit de ADN de sangre QiaAmp y demostraron que el ADN era detectable en los flebotomíinos hasta más de 48 h después de la ingesta de sangre.

Para aquellas muestras, donde no se logró la identificación del ADN del reservorio vertebrado, el ADN podría haber sido insuficiente para la amplificación, el proceso de la digestión puede haber desnaturalizado el ADN o los flebotomíinos pueden haberse alimentado de un animal no incluido en el análisis, como también lo reportó el estudio de Brazil et al (1991). Esto puede ser debido a que las chitras ingieren cantidades minúsculas de sangre y no puede ser suficiente ADN del reservorio, especialmente en las chitras parcialmente alimentadas (Rogers et al, 2002). Kent y Norris (2005) mostraron que al menos 50 ng era necesario para una amplificación visible. En nuestras amplificaciones por PCR, desde 10 ng era suficiente para la visualización de la banda utilizando extracciones de ADN genómico de los pools que resultaron positivos.

*Lu. trapidoi* fue la especie con mayor asociación a ingerir sangre de humanos y de aves como segunda opción en nuestro estudio. Un estudio realizado en áreas boscosas en el

Limbo y Aguacate (Panama Centro), indicaba que el 70% de la alimentación de *Lu trapidoi* era roedores, primates y desdentados, los órdenes de mamíferos encontrados infectados más frecuentemente con *Le braziliensis* (Tesh et al, 1971)

Mientras que *Lu gomezi*, presentó una mayor asociación de ingerir sangre de cerdo, aves y perro como primeras opciones antes de ingerir sangre humana según los resultados obtenidos en este estudio. Esto es contrario a los reportes de que *Lu gomezi* exhibe una marcada apetencia a picar al humano en lugares como en los alrededores del domicilio humano, o en las zonas deforestadas, donde la vegetación es escasa (Porter y De Fohart, 1981, Feliciangeli, 1987 y 1997, Valderrama et al, 2014)

Esto sugiere que esta especie vectora se encuentra adaptada a los nuevos cambios medio-ambientales, modificando su conducta de alimentación, por lo que los patrones de transmisión de LT también pudieran ser cambiados. En este sentido, en Panamá se reporta que las poblaciones de *Lu gomezi* se adaptan fácilmente a picar a un rango más amplio de vertebrados, tanto en áreas peridomiciliares como intradomiciliarias, lo que hace que su control sea más complicado (Saldaña et al 2013, Valderrama et al 2014)

*Lu panamensis*, presentó una mayor asociación de ingerir sangre de cabra como primera opción y luego sangre de humano, es una especie de flebotomino considerada antropofílica, pero también se alimenta de otras fuentes, especialmente de roedores (Contreras, 2013, Dutari y Loaiza, 2014, Feliciangeli, 2014)

*Lu dysponeta*, presentó una mayor asociación a la ingesta de sangre de cabra en nuestro estudio y *Lu triramula*, presentó una mayor asociación de ingerir sangre de cerdo. En Panamá se le tienen como una especie de hábitos zoofílicos, que se capturan en ambientes peridomiciliares y domiciliarios, siendo atraídas por la luz, así como también en bosques primarios (bosque húmedo tropical, bosque muy húmedo tropical) como en áreas de cultivo (Valderrama et al, 2008, Chaves et al, 2013, Cazorla-Perfetti, 2015)

Tanura et al (2015) reportó la presencia de más de una fuente de sangre en algunas hembras, reforzando el eclecticismo en la alimentación de estas especies, lo que demuestra que estos flebotomíneos normalmente ajustan su patrón de alimentación de acuerdo a la disponibilidad de hospederos. Esto también se observó en nuestros resultados con los pools analizados, donde se detectó sangre humana en los pool de *Lu gomezi*, *Lu trapidoi* y *Lu panamensis*, lo que demuestra su comportamiento antropofílico. Además, la capacidad de alimentarse de una variedad de especies de hospederos y mostrar los perfiles de alimentación mezclados (cerdo + humano/ perro + humano/ cabra + humano/ vaca + cerdo/ perro + ave/ perro + cabra/ cerdo + cabra) refuerza su papel como los principales vectores de LC en esta comunidad de Panamá Oeste.

## 7. CONCLUSIONES

Se encontró una amplia diversidad de especies del género *Lutzomyia* en la comunidad de Trinidad de las minas y de esa diversidad se identificaron 6 especies antropofílicas incriminadas en la transmisión de la LC

Los resultados confirman la infección con *Leishmania* spp en las principales especies de flebotominos antropofílicos (*Lu trapidoi*, *Lu panamensis* y *Lu gomezi*) encontradas en el domicilio y peridomicilio de la comunidad de Trinidad de Las Minas, en el distrito de Capira

*Lu trapidoi* fue la especie más propensa a estar infectada por *Leishmania* spp (alta prevalencia de 0.189), y sus pools estaban principalmente asociados a la ingesta de sangre de humanos y aves

El análisis de los pools en cuanto al tipo de ingesta sanguínea, indica que la mayoría de las especies de *Lutzomyia* evaluadas se alimentaron de aves y perros y se detectó sangre humana en los pool de *Lu gomezi*, *Lu trapidoi* y *Lu panamensis*, lo que reafirma su comportamiento antropofílico

Existe una relación entre las especies antropofílicas de *Lutzomyia* con la tasa de infección y el tipo de ingesta sanguínea, antes y después de una intervención con insecticida. Tal como se observó al disminuir la tasa de prevalencia de infección de *Lu trapidoi*

Estos resultados sustentan la importancia de implementar una vigilancia activa utilizando estos parámetros, para predecir brotes y desarrollar nuevas estrategias de control o integrar las existentes para reducir los casos de leishmaniasis cutánea en Panamá

## 8. RECOMENDACIONES

En los últimos años la domiciliación de la transmisión de la leishmaniasis se ha reportado de manera frecuente en Latinoamérica, lo cual fue muy discutido por Campbell et al (2001), Calzada et al (2013) y Hoyos-Lopez et al (2016), que presentan posibilidades de control a nivel doméstico. Sin embargo, para que las medidas de control sean exitosas se recomienda que, además de la definición de los vectores, se estudien parámetros de comportamiento como la actividad horaria de picadura, la endofilia de cada vector, los sitios de cría, con el fin de identificar las áreas de emergencia más probable y para generar una estrategia de prevención para esta enfermedad en nuestro país.

También recomendamos realizar otros estudios de detección de las especies de *Leishmania* presentes en las poblaciones de *Lutzomyia* de esta región del país con otros marcadores moleculares (por ejemplo kDNA, HSP70, ITS-2, RFLP).

Sería interesante investigar el papel que juegan las especies zoonóticas de *Lutzomyia* en la dinámica de transmisión de la Leishmaniasis en esta región donde se reportan casos de lesiones.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard-Hansen, J, Nombela, N y Alvar, J 2010, Population movement a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases *Tropical Medicine & International Health*, 15 1281–1288 doi 10.1111/j.1365-3156.2010.02629.x
- Abbasi, I, Cunio, R y Warburg, A 2009 Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting *VectorBorne Zoon Dis* 9 79–86
- Afonso, MM, Duarte, R, Miranda, JC, Caranha, L y Rangel, EF 2012 Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera Psychodidae Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil *J Trop Med* 858657
- Agrela, I, Sanchez, E, Gómez, B y Feliciangeli, MD 2002 Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela *J Med Entomol* 39 440–445
- Alvar, J, Vélez, ID, Bern, C, Herrero, M, Desjeux, P, Cano, J et al 2012 Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence *PLoS ONE* 7 e35671
- Añez, N, Rojas, A, Vargas-Díaz, E, Medina, V, Crisante, G y Yépez, JY 2012 Estudio epidemiológico sobre leishmaniasis visceral en la región semiárida del occidente de Venezuela con especial referencia a la detección de infecciones inaparentes *Bol Malar Salud Ambient*, 52 245–256
- Arez, AP, Lopes, D, Pinto, J, Franco, AS, Snounou, G y do Rosário, VE 2000 *Plasmodium* sp optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp) samples *Exp Parasitol* 94(4) 269–72 PMID 10831396
- Arias, JR, Miles, MA, Naiff, RD, Póvoa, MM, Freitas, RA, Biancardi, CB y Castellon, EG 1985 Flagellate infection of Brazilian sandflies (Diptera Psychodidae) Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania* *Am J Trop Med Hyg*, 34 1098–1108
- Arias, J, Beltran, F, Desjeux, P y Walton, B 1996 Epidemiologia y control de la leishmaniasis en las Américas Cuaderno Técnico N° 44 OPS Washington, USA
- Ashford, R 1996 “Leishmaniasis reservoirs and their significance in control,” *Clinical Dermatology*, vol 14, pp 523–532
- Ashford, R 1997 “What it takes to be a reservoir host,” *Belg J Zool*, vol 127, pp 85–90



Azpurua, J, de la Cruz, D, Valderrama, A, Windsor, D 2010 *Lutzomyia* sandfly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama *PLoS Negl Trop Dis* 4 e627

Barrett, T V, Freitas, R A, Albuquerque, M I C, y Guerrero, J C H 1996 Report on a collection of *Lutzomyia* Sand Flies (Diptera Psychodidae) from the Middle Solimões (Amazonas, Brazil) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(1) 27-35

Barrios, MA, Rodriguez, N, Feliciangeli, DM, Ulrich, M y Pinardi, ME 1994 Coexistence of two species of *Leishmania* in the digestive tract of the vector *Lutzomyia ovallesi* *Am J Med Hyg*, 51 5 669-75

Brandao-Filho, SP, Brito, ME, Carvalho, FG, Ishikawa, EA, Cupolillo, E, Floeter-Winter, L y Shaw, JJ 2003 "Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of amaraji, pernambuco state, brazil" *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol 97, no 3, pp 291-296

Brazil, R P, Almeida, D C, Brazil, B G y Mamede, S M P O 1991 Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil *Parasitologia* 33 (Suppl 1) 113-117

Bejarano, E, Uribe, S, Rojas, W y Vélez, IV 2002 Phlebotomine sand flies (Diptera Psychodidae) associated with the appearance of urban Leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 645-647

Bejarano EE 2006 Lista actualizada de los psicódidos (Diptera Psychodidae) de Colombia *Folia Entomol Mex* 2006, 45 47-56

Bensoussan, E, Nasereddin, A, Jonas, F, Schnur, LF y Jaffe, CL 2006 Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis *J Clin Microbiol* 44 1435-1439

Bermudez, H, Solano, M, Torrico Rojas, MC, Carballo Montero, M, Lafuente Covarrubias, O, Lara Arias, MP y Paredes Torrico, P 2005 Diagnóstico de Leishmaniasis Utilizando Medio de Cultivo Tsb en Pacientes de Tropico de Cochabamba *Gaceta Médica Boliviana*, 28(2), 31-35

Bongiorno, G, Habluetzel, A, Khoury, C y Maroli, M 2003 Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy *Acta Trop* 88 109-116

Bosseno, MF, García, LS, Baunaure, F, Gastelum, EM, Gutierrez, MS, Kasten, FL, Dumonteil, E y Brenière, SF 2006 Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex minixon polymerase chain reaction *Am J Trop Med Hyg*, 74 303-305

- Brito, VN, Almeida Ado, B, Nakazato, L, Duarte, R, Souza, CO y Sousa, VR 2014 Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil Mem Inst Oswaldo Cruz 109(7) 899-904
- Cabrera, OL, Neiraz, M, Bello, F y Ferro, C 1999 Ciclo de vida y colonización de *Lutzomyia ovallesi* (Diptera Psychodidae), vector de *Leishmania* spp en América Latina Biomédica 1999 19(3) 223-9
- Cabrera, OL, Munstermann, L, Cardenas, R, Gutierrez, R, Ferro, C 2002 Definición de las Condiciones de Temperatura y Almacenamiento Adecuadas en la Detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos Biomédica 22(003) 296-302
- Calzada, JE, Saldaña, A, Rigg, C, Valderrama, A, Romero, L Chaves, LF 2013 Changes in Phlebotomine Sand Fly Species Composition Following Insecticide Thermal Fogging in a Rural Setting of Western Panamá PLoS ONE 8(1) e53289 doi 10.1371/journal.pone.0053289
- Calzada, JE, Saldaña, A, González, K, Rigg, C, Pineda, V, Santamaría, AM et al 2015 Cutaneous Leishmaniasis in dogs is high seroprevalence indicative of a reservoir role? Parasitology, 142 (9) 1202-1214
- Campbell-Lendrum, D, Dujardin, JP, Martinez, E, Feliciangeli, MD, Perez, JE, Silans, LN et al 2001 Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis changing epidemiological patterns present new control opportunities Mem Inst Oswaldo Cruz 96 159-62
- Cazorla-Perfetti, D 2015 Lista Comentada de los Flebotominos (Diptera Psychodidae, Phlebotominae ) Citados Para Venezuela Saher Revista Multidisciplinaria Del Consejo De Investigación De La Universidad De Oriente, Vol 27, Num 2, 2015, Pp 178-231
- Chaves, LF y Añez, N 2004 Species co-occurrence and feeding behavior in sand fly transmission of American cutaneous leishmaniasis in western Venezuela Acta Tropica, 92 219-224
- Chaves, LF, Cohen, JM, Pascual, M y Wilson, ML 2008 Social Exclusion Modifies Climate and Deforestation Impacts on a Vector-Borne Disease PLoS Negl Trop Dis, 2 e176
- Chaves, LF, Calzada, JE, Rigg, C, Valderrama, A, Gottdenker, NL y Saldaña, A 2013 Leishmaniasis sand fly vector density reduction is less marked in destitute housing after insecticide thermal fogging Parasites & Vectors, 6, 164 doi 10.1186/1756-3305-6-164

Chaves, LF, Calzada, JE, Valderama, A. y Saldaña, A 2014 Cutaneous leishmaniasis and sand fly fluctuations are associated with El Niño in Panamá PLOS Negl Trop Dis, 8 e3210

Christensen, HA, Herrero, A y Telford, SR Jr 1972 Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama II Entomological investigations Ann Trop Med Parasitol 66 55–66

Christensen, H y A Herrero 1973 Attractiveness of sentinel animals to vectors of Leishmaniasis in Panamá American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 22 578-584

Christensen, HA, Fairchild, GB, Herrero, A, Johnson, CM, Young, DG y De Vasquez, AM 1983 The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama J Med Entomol, 20 453-84

Christensen, H, Johnson, C y Vásquez, AM 1984 Leishmaniasis cutanea en Panamá un breve resumen Rev Med Panama, 9 182-1987

Christensen, HA, de Vasquez, AM, Petersen, JL 1999 Short report epidemiologic studies on cutaneous leishmaniasis in eastern Panama Am J Trop Med Hyg 60 54–57

Cochero, S, Anaya, Y, Díaz, Y, Paternina, M, Luna, A, Paternina, L y Bejarano, EE 2007 Natural infection of *Lutzomyia cayennensis cayennensis* with trypanosomatid parasites (Kinetoplastida Trypanosomatidae) in Los Montes de Maria, Colombia Rev Cubana Med Trop 59 (1) 35-9

Contreras G, MA. 2013 *Lutzomyia* spp (Diptera Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana taxonomía e importancia médica Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Medellín, Colombia 196 pp

Córdoba-Lanus, E, De Grosso, ML, Piñero, JE, Valladares, B y Salomon, OD 2006 Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp in northwestern Argentina Acta Trop 98(1) 1-5

Crum, N F, Aronson, N E, Lederman, E R, Rusnak, J M y Cross, J H 2005 History of U S military contributions to the study of parasitic diseases Mil Med 170, 17–29

Cupolillo, E, Van der Auwera, G, Cruz, I, Schoenian, G, Kuhls, K y Mauricio, I 2009 Manual Molecular Procedures Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 53 pp

Danabalan, R, Monaghan, M T, Ponsonby, D J y Linton, Y M 2014, Occurrence and host preferences of *Anopheles maculipennis* group mosquitoes in England and Wales Medical and Veterinary Entomology, 28 169–178 doi 10.1111/mve.12023

Darling, ST 1910 Autochthonous Oriental sore in Panama. *Trans Soc Trop Med & Hyg*, 4 60-63)

Dávila, AM y Momen, H 2000 Internal Transcriber Spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania* Am J Trop Parasitol 94 651-4

De Lima, H, De Guglielmo, Z, Rodriguez, A, Convit, J y Rodriguez, N 2002 "Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp In Lara state, Venezuela," *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol 97, pp 169-174

Depaquit, J, Léger, N y Robert, V 2007 Les Phlébotomes de Madagascar (Diptera – Psychodidae) V – Description de *Sergentomyia majungaensis* n sp Parasite, 14, 219-223

De Pita-Pereira, D, Alves, CR, Souza, MB, Brazil, RP, Bertho, AL, de Figueiredo Barbosa, A y Britto, CC 2005 Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay Trans R Soc Trop Med Hyg, 99(12) 905-13

De Vasquez, AM, Saenz, RE, Petersen, JL, Christensen, HA y Johnson, CM 1990 *Leishmania mexicana* complex human infections in the Republic of Panama Am J Trop Med Hyg 43 619-622

Dougherty, MJ, Ward, RD y Hamilton, JGC 1992 Evidence for the accessory glands as the site of production of the oviposition attractant and/or stimulant of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera Psychodidae) J Chem Ecol 18 1165-1175

Do Nascimento, JC, de Paiva, BR, dos Santos Malafronte, R, Fernandes, WD y Galati, EA 2007 Natural infection of phlebotomines (Diptera Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil Rev Inst Med Trop, 49 (2) 119-22

Dutari, LC y Loaiza, JR 2014 American cutaneous leishmaniasis in Panama a historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species *Parasites & Vectors* 7 218 doi 10.1186/1756-3305-7-218

Eldridge, B F y Edman, John 2000 Medical Entomology A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods ISBN 978-0-7923-6321-7 (Print) 978-94-011-6472-6 (Online) 620 pp

Escovar, J, Bello, F, Morales, A, Moncada, L y Cárdenas, E 2004 "Life tables and reproductive parameters of *Lutzomyia spicrassa* (Diptera Psychodidae) under laboratory conditions," *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol 99, pp 603-607

Estrada-Peña, A, Osácar, JJ, Pichon, B y Gray, JS 2005 Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari Ixodidae) in north-central Spain Exp Appl Acarol, 37 257–268

Farrington, CP 1992 Estimating prevalence by group testing using generalized linear models Statistics in Medicine 11 1591-1597

Feliciangeli, M 1987 Ecology of sandflies (Diptera Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela II Species composition in relation to habitat, catching method and hour of catching Mem Inst Oswaldo Cruz 82(1) 125-131

Feliciangeli, MD, Reyes, RM y Limongi, JE 1988 Natural Infection of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera Psychodidae) With Parasites Of The *Leishmania Braziliensis* Complex In A Restricted Focus Of Cutaneous Leishmaniasis In Northern Venezuela Mem Inst Oswaldo Cruz [Online] Vol 83, N 3, Pp 393-394 Issn 1678-8060 Http //Dx Doi Org/10 1590/S0074-02761988000300019

Feliciangeli, M 2014 Leishmaniasis en Venezuela situacion actual, acciones y perspectivas para el control vectorial en el marco de un programa de control multisectorial Bol Mal Salud Amb 54(1) 1-7

Fernandez, MS 2012 Eco-Epidemiología De Vectores De Leishmania Spp En El Noreste De La Argentina (Provincia De Misiones) Tesis Doctoral Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemoepidemias (CeNDIE) Universidad de Buenos Aires 110 pp

Ferro, C, Cabrera, OL, Ayala, M, Santamaria, E, Castillo, M y Neira, M 1998 Especies del grupo verrucarum (Diptera Psychodidae) y su papel como vectores de dos focos de *Leishmania braziliensis* del centro de Colombia Resúmenes, XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Cali 41 pp

Ferro, C, Cárdenas, E, Corredor, D, Morales, A y Munstermann, LE 1998 Life Cycle and Fecundity Analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera Psychodidae) Mem Inst Oswaldo Cruz 93(2) 195 -199

Fornadel, CM y Norris, DE 2008 Increased endophily by the malaria vector *Anopheles arabiensis* in southern Zambia and identification of digested blood meals Am J Trop Med Hyg 79 876-880

Galati, EAB 2003 Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América Pp 53-175 Em Rangel EF, Lanson R (eds ) Flebotomíneos do Brasil Rio do Janeiro Editora Fiocruz 368pp

Galati, EAB 2010 Classificação Morfologia e Terminologia E Identificação de Adultos Vol I Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae

Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saude Publica Universidade de São Paulo  
Av Dr Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil

Gómez, B, Sánchez, E y Feliciangeli, MD 1998 Man-vector contact of phlebotomine sand flies (Diptera Psychodidae) in north-central Venezuela as assessed by blood meal identification using dot-ELISA *J Am Mosq Contr Assoc* 14 28-32

Gómez, EA, Kato, H y Hashiguchi, Y 2014 Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador *Acta Trop* 140 41-9

González, E, Gallego, M, Molina, R, Abras, A, Alcover, M, Ballart, C, Fernández, A y Jiménez, M 2015 Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene *Acta Tropica* 152 96–102

González, K, Calzada, JC, Saldaña, A, Rigg, C, Alvarado, G, Rodríguez-Herrera, B, Kitron , UD, Adler, G, Gottdenker, N, Chaves, LF y Baldi, M. 2015 Short Communications Survey of Wild Mammal Hosts of Cutaneous Leishmaniasis Parasites in Panamá and Costa Rica *Tropical Medicine and Health* Vol 43 No 1, 2015, 75–78 doi 10 2149/tmh 2014-30

Grevelink, SA y Lerner, EA 1996 Leishmaniasis *Journal of the American Academy of Dermatology* 34, 257–272

Grimaldi, G y Tesh, R 1993 “Leishmaniasis of the new word current concepts and implications for future research,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol 6, pp 230–250

Guzman, H, Walters, LL y Tesh, RB 1994 Histologic detection of multiple blood meals in *Phlebotomus duboscqi* (Diptera Psychodidae) *J Med Entomol*, 31 890–897

Haouas, N, Pesson, B, Boudabous, R, Dedet, JP, Babba, H, Ravel, C 2007 Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors *Am J Trop Med Hyg* 77 1054-9

Hashiguchi, Y, Gómez, LEA, de Coronel, VV, Mimori, T y Kawabata, M 1985 Natural infections with promastigotes in man-biting species of sand flies in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador *Am J Trop Med Hyg*, 34(3) 440-6

Hashiguchi, Y, Chiller, T, Inchausti, A, De Arias, A, Kawabata, M y Alexander, JB 1992 Phlebotomine sandfly species in Paraguay and their infection with *Leishmania* *Am J Trop Med Hyg* 86(2) 175-180

Haydon, D, Cleaveland, S, Taylor, L y Laurenson, K 2002 “Identifying reservoirs of infection a conceptual and practical challenge,” *Emerging Infectious Diseases*, vol 3, pp 1468–1472, 2002

- Hernández-Montes, O, Monroy-Ostria, A, McCann, S y Barker, DC 1998 "Identification of Mexican *Leishmania* species by analysis of PCR amplified DNA," *Acta Tropica*, vol 71, no 2, pp 139–153
- Herrer, A 1971 *Leishmania hertigi* sp n, from the tropical porcupine, *Coendou rothschildi* *J Parasitol* 57 626–629
- Herrer, A, Telford, SR Jr., Christensen, HA 1971 Enzootic cutaneous leishmaniasis in Eastern Panama I Investigation of the infection among forest mammals *Ann Trop Med Parasitol* 65 349–358
- Herrer, A y Christensen, HA 1976 Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama *Am J Trop Med Hyg* 25 59–63
- Herrer, A y Christensen, HA 1980 *Leishmania braziliensis* in the Panamanian Two-Toed Sloth, *Choloepus hoffmanni* *Am J Trop Med Hyg*, 29 1196–1200
- Ibáñez, BS 1999 Phlebotominae de Mexico I *Brumptomyia* França y Parrot, *Lutzomyia* França, las especies de *L (Lutzomyia) França* y del grupo verrucarum *Folia Entomol Mex* 107 61–116
- Ibáñez, BS, Hernández-Xoliot, R y Mendoza, F 2006 Collections of *Bruchomyiinae* and *Phlebotominae* (Diptera Psychodidae) from the north-central portion of the State of Veracruz, Mexico, with the description of a new species *Zootaxa*, 1270 19–33
- Jaramillo, C, Travi, BL y Montoya, J 1994 Vector competence of some Neotropical sandflies for the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex *Med Vet Entomol* 8 1–7
- Javadian, E, Tesh, R, Saidi, S y Nadim, A 1977 Studies on the epidemiology of sand fly fever in Iran III Host-feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* in an endemic area of the disease *Am J Trop Med Hyg* 26 294–298
- Jorquera, A, González, R, Marchán-Marcano, E, Oviedo, M y Matos, M 2005 Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(1) 45–8
- Kato, H, Uezato, H, Gomez, E, Terayama, Y, Calvopiña, M, Iwata, H y Hashiguchi, Y 2007 Establishment of a Mass Screening Method of Sand Fly Vectors for *Leishmania* Infection by Molecular Biological Methods *Am J Trop Med Hyg*, 77(2), pp 324–329
- Kato, H, Gomez, EA, Cáceres, AG, Vargas, F, Mimori, T, Yamamoto, K, Iwata, H, Korenaga, M, Velez, L y Hashiguchi, Y 2011 *Natural infections of man-biting sand*

- flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes Vector Borne Zoonotic Dis 11 (5) 515-21
- Kent, RJ y Norris, DE 2005 Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b Am J Trop Med Hyg 73 336-342
- Kent, RJ, Coetzee, M, Mharakurwa, S y Norris, DE 2006 Feeding and indoor resting behaviour of the mosquito *Anopheles longipalpis* in an area of hyperendemic malaria transmission in southern Zambia Med Vet Entomol, 20 459-463
- Killick-Kendrick, R, Molyneux, DH y Ashford, RW 1974 *Leishmania* in phlebotomid sandflies I Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly Proc R Soc B 187 409-419
- Killick-Kendrick, R 1990 Phlebotomine vectors of the leishmaniasis a review Med and Vet Entomol, 4 1-24
- Killick-Kendrick, R 1999 The biology and control of phlebotomine sand flies R Clin Dermatol 17(3) 279-289
- Kirstein, F y Gray, JS 1996 A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its european vector *Ixodes ricinus* Appl Environ Microbiol, 4060-4065
- Kocher, TD, Thomas, WK, Meyer, A, Edwards, SV, Paabo, S, Villablanca, FX, Wilson, AC 1989 Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals amplification and sequencing with conserved primers Proc Natl Acad Sci USA 86 6196-6200
- Kreutzer, RD, Corredor, A, Grimaldi, G Jr, Grogli, M, Rowton, ED, Young, DG, Morales, A, McMahon-Pratt, D, Guzman, H, Tesh, RB 1991 Characterization of *Leishmania colombiensis* sp n (Kinetoplastida Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama Am J Trop Med Hyg 44 662-675
- Laney, SJ 2007 DNA extraction from pooled Mosquito/*W bancrofti*/*B malayi* SOP #13 Department of Biological Sciences, Smith College, Northampton, Massachusetts, United States of America, Zoology Department
- Lawyer, PG y Young, DG 1987 Experimental transmission of *Leishmania mexicana* to hamsters by bites of phlebotomine sand flies (Diptera Psychodidae) from the United States J Med Entomol 24 458-462



- Leng, YJ 1987 A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinnus* Ann Trop Med Parasitol, 81 (3) 311–317
- Lewis, DJ, Young, DG, Fairchild, GB y Minter, DM 1977 Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera Psychodidae) System Entomol, 2 (4) 319–332
- Lucientes, J, Antonio, J, Gracia, MJ y Peribañez, MA 2005 Flebotomos, de la biología al control REDVET, 6 (8)
- Mahmoudzadeh-Niknam, H, Abrishami, F, Doroudian, M, Moradi, M, Alimohammadian, M, Parvizi, P, Hatam, G, Mohebbi, M y Khalaj, V 2011 The Problem of Mixing up of *Leishmania* Isolates in the Laboratory Suggestion of ITS1 Gene Sequencing for Verification of Species Iran J Parasitol 6 (1) 41–48
- Maleki-Ravasan, N, Oshaghi, M, Javadian, E, Rassi, Y, Sadraei, J y Mohtarami, F 2009 Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases, 3(1), 8–18
- Marassa, AM, Consales, CA, Galati, EAB y Nunes, VL 2006 Blood meals identification of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi* (Galati & Nunes, 1999) by enzyme-linked immunosorbent assay biotin-avidin Rev Soc Bras Med Trop 39(2) 183–6
- Marco, J, Barroso, P, Calvopiña, M, Kumazawa, H, Furuya, M, Korenaga, M, Cajal, S, Mora, M, Rea, M, Borda, C *et al*, 2005 “Species assignation of *Leishmania* from human and canine american tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in north argentina,” *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol 72, no 5, pp 606–611
- Marcondes, CB, Bittencourt, IA, Stoco, PH, Eger, I, Grisard, EC y Steindel, M 2009 Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) spp in Brazil Trans R Soc Trop Med Hyg 103 (11) 1093–7
- Maroli, M, Feliciangeli, D, Bichaud, L, Charrel, R y Gradoni, L 2012 Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern Med Vet Entomol 1-25 doi 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
- Martins, AV, Williams, P y Falcão, AL 1978 American Sand Flies Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro 195 pp

- Mello, M y Barbosa, S 1985 "Roedores da regio neotropical e patogenos de importancia para o homem," *Sao Carlos UFSCar*
- Méndez, E 1999 Insectos y otros artrópodos de importancia médica y veterinaria, Impresora Pacifico, Panamá, 45 pp
- Michalsky, EM, Fortes-Dias, CL, Pimenta, PF, Secundino, NF y Dias, ES 2002 Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera Psychodidae Phlebotominae) *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44 255-259
- Ministerio de Salud de Panamá (MINSA) 2014 Informe anual de Epidemiología de la Leishmaniasis
- Ministerio de Salud de Panama (MINSA) 2015 Informe Anual del Departamento de Epidemiología Dirección General de Salud Pública
- Miranda, A, Carrasco, R, Paz, H, Pascale, JM, Samudio, F, Saldaña, A, Santamaria, G, Mendoza, Y, Calzada, JE 2009 Molecular Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Panamá *Am J Trop Med Hyg*, 81(4) 565-571
- Miranda, A, Saldaña, A, González, K, Paz, H, Santamaria, G, Samudio, F 2012 Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012, 106 544-548
- Miranda, J C, Reis, E, Schriefer, A, Gonçalves, M, Reis, M.G, Carvalho, L, Fernandes, O, Barral-Netto, M y Barral, A 2002 Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(2) 185-188
- Molaei, G, Oliver, J, Andreadis, TG, Armstrong, PM y Howard, JJ 2006 Molecular identification of blood-meal sources in *Culiseta melanura* and *Culiseta morsitans* from an endemic focus of eastern equine encephalitis virus in New York *Am J Trop Med Hyg*, 75 1140–1147
- Molina, JA 1995 Determinación de la fauna flebotomínea en el noroccidente de Boyacá Implicación de *Lutzomyia trapidoi* como especie vectora en el foco de leishmaniasis de la Zambora (trabajo de grado) Bogotá Universidad de los Andes, 98 pp
- Monroy-Ostria, A, Nasereddin, A, Monteon, V, Guzmán-Bracho, C, y Jaffe, C 2014 ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican

Southeast Hindawi Publishing Corporation Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases Volume Article ID 607287, 6 p

Montoya-Lerma, J y Ferro, C 1999 Flebótomos (Diptera Psychodidae) de Colombia En Amat, G, M G Andrade y F Fernández (eds ), Insectos de Colombia, Volumen II Colección Jorge Álvarez Lleras, No 13, Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Centro Editorial Javeriano, Santafé de Bogotá 211-245

Morrison, AC, Ferro, C, Morales, A, Tesh, RB y Wilson, ML 1993 Dispersal of the sand *Lutzomyia longipalpis* (Diptera Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia J Med Entomol 30 427-435

Morsy, TA, Aboul Ela, RG, Abdelmawla, M y Gozamy, BM 1993 Counter immunoelectrophoresis, a modified technique for the identification of blood meals of sandflies collected from Qualyobia Governorate J Egypt Soc Parasitol, 23 109–132

Moya, S, Giuliani, M, Manteca Acosta, M, Salomón, OD y Liotta, DJ 2015 First Description Of *Migonemyia migonei* (França) And *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae Phlebotominae) Natural Infected By *Leishmania infantum* In Argentina Acta Trop 152 181–184

Munstermann, LE 2004 Phlebotomine sand flies, the Psychodidae In Marquardt, W C, Black, WC, Freier JE, Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG (Eds ) Biology of Disease Vectors, Second edition Elsevier, San Diego, CA 141–151 pp

Munstermann, LE 2005 Phlebotomine sand flies, the Pshychodidae In Biology of disease vectors (2nd edn) Mrquardt WC (Ed) Elsevier Academic Press 141 -151

Neitzke, HC, Scodro, RB, Castro, KR, Sversutti, AC, Silveira, TG y Teodoro, U 2008 Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná Rev Soc Bras Med Trop, 41(1) 17-22

Neitzke-Abreu, HC, Reinhold-Castro, KR, Venazzi, MS, Scodro, RB, Dias Ade, C, Silveira, TG, Teodoro, U y Lonardoní, MV 2014 Detection of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in Southern Brazil Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 56 (5) 391-5

Nery, LC, Lorosa, NE y Franco, AM. 2004 Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil Mem Inst Oswaldo Cruz 99 571-4

- Ngo, KA y Kramer, LD 2003 Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers J Med Entomol 40 215-222
- Nieves, E, Davila - Vera, D y Palacios-Pru, E 2004 Daño ultraestructural del intestino medio abdominal de *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera Psychodidae) ocasionado por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Parasitol latinoam [online] 2004, vol 59, n 3-4, pp 115-122 ISSN 0717-7712 <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122004000300005>
- Nieves, E, Sánchez, Y, Sánchez, H, Rondón, M, González, N, y Carrero, J 2012 Sandfly Saliva of *Lutzomyia Ovallesi* (Diptera Psychodidae) As A Possible Marker For The Transmission of *Leishmania* In Venezuela Andes Region J Vector Borne Dis 2012 Mar, 49(1) 8-14
- Oliveira, FS, Pirmez, C, Pires, MQ, Brazil, RP y Pacheco, RS 2005 "PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in brazil," *Veterinary Parasitology*, vol 129, no 3-4, pp 219-227 Available <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.01.005>
- Oliveira-Pereira, YN, Rebêlo, JM, Moraes, JL y Pereira, SR 2006 Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil Rev Soc Bras Med Trop 39 (6) 540-3
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 2015 Leishmaniasis Nota descriptiva N° 375 Centro de Prensa <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Oshaghi, MA, Chavshin, AR, Vatandoost, H 2006 (a) Analysis of mosquito blood meals using RFLP Markers Exp Parasitol 114 259-264
- Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H, Yaaghoobi F, Mohtarami F, Noorjah N 2006 (b) Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes Exp Parasitol 112 232-236
- Oskam, L, Slappendel, R J, Beijer, E G, Kroon, N C M, Ingen, C W, Ozensoy, S, Ozbel, Y y Terpstra, W 1996 Dog-DAT a direct agglutination test using stabilized freeze - dried antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis FEMS Immun Med Microbiol 16 235-239
- Padilla, A, Marco, J, Diosque, P, Segura, M, Mora, M, Fernandez, M, Malchiodi, E y Basombrio, M 2002 "Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina," *Veterinary Parasitology*, vol 110, pp 1-10
- Paiva, BR, Secundino, NF, Nascimento, JC, Pimenta, PF, Galati, EA, Junior, HF y Malafronte, RS 2006 Detection and identification of *Leishmania* species in field-

- captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR Acta Trop, 99 (2-3) 252-9
- Palatnik-de-Sousa, C y Day, M 2011 One Health The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis Parasites & Vectors, 4 197
- Pereira Junior, AM, Garcia Teles, CB de Azevedo dos Santos, AP, de Souza Rodrigues, M, Marialva, EF, Costa Pessoa, FA y Fernandes Medeiros, J 2015 Ecological Aspects and Molecular Detectio of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida Trypanosomatidae) In Phlebotomine Sandflies (Diptera Psychodidae) In Terra Firme And Várzea Environments In The Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil Parasit Vectors 8 180
- Perez, JE, Ogusuku, E, Inga, R, López, M, Monje, J, Paz, L et al 1994 Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru Trans R Soc Trop Med Hyg, 88 161-4
- Perruolo, G, Rodríguez, N y Feliciangeli, MD 2006 Isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from *Lutzomyia spinicrassa* (species group *Verrucarum*) Morales Osorno Mesa, Osorno and Hoyos 1969, in the Venezuelan Andean region Parasite 13(1) 17-22
- Pichon, B, Egan, D, Rogers, M y Gray, J 2003 Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L (Acari Ixodidae) J Med Entomol, 40 723-731
- Pizarro, JC, Lucero, D y Stevens, L 2007 A method for the identification of guinea pig blood meal in the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* Kinetoplastid Biol Dis, 6 1
- Porter, C y De Foliart, G 1981 The man-biting activity of phlebotomine sand flies (Diptera Psychodidae) in tropical wet forest environment in Colombia Arq Zool São Paulo 30(2) 81-158
- Quaresma, PF, de Lima Carvalho, GM, Ramos, MCNF y Andrade Filho, JD 2012 Natural *Leishmania* spp reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil Mem Inst Oswaldo Cruz 107(4) 480-485
- Rangel, E, Souza, N, Wermelinger, E y Barbosa, A. 1985 “Estabelecimento de colonia, em laboratorio, de *Lutzomyia intermedia* lutz & neiva, 1912 (Diptera, Psychodidade), phlebotominae,” *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol 80, pp 219-226
- Rangel, E, Souza, N, Wermelinger, E, Barbosa, A y Andrade, C 1986 “Biologia de *Lutzomyia intermedia* lutz & neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* lutz & neiva, 1912 (Diptera, Psychodidade), em condicoes experimentais 1 aspectos da alimentacao de larvas e adultos,” *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol 81, pp 431-438

- Ready, PD 2008 "Leishmaniasis emergence and climate change," *Rev sci tech Off int Epiz* , vol 27, pp 399–412
- Reithinger, R y Davies, C 1999 "Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? a critical review of the current evidence," *Am J Trop Med Hyg*, vol 61, pp 530–541
- Reithinger, R, Dujardin, JC, Louzir, H, Pirmez, C, Alexander, B y Brooker, S 2007 Cutaneous leishmaniasis *The Lancet Infectious diseases* Vol 7(9) 581-596
- Restrepo, CM, Pérez Lao, E, De la Guardia, C, Sousa, OE, Calzada, JE y Leonart, R 2011 Amplified fragment length polymorphism reveals high intraspecific variability in field isolates of *Leishmania panamensis* *Curr Trends Biotechnol Pharm* 5 1183-1192
- Rodriguez, N, De Lima, H, Aguilar, CM, Rodriguez, A, Barker, DC y Convit, J 2002 Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1 S105-9
- Rogers, ME, Chance, ML y Bates, PA 2002 The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis* *Parasitology* 124 495–507
- Romero, GA, Guerra, MV, Paes, MG, Cupolillo, E, Bentin Toaldo, C, Macedo, VO y Fernandes, O 2001 Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis* *Acta Trop* 22, 79(3) 225-9
- Rossi, E, Bongiorno, G, Ciolli, E, Di Muccio, T, Scalone, A, Gramiccia, M, Gradoni, L y Maroli, M 2008 Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy *Acta Trop* 105 158-165
- Ruiz Márvez, E 2011 Estandarización de la Técnica de Amplificación del Gen Citocromo B, para Identificar la Fuente de Alimento de *Cx Quinquefasciatus* en el Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina, Departamento de Salud Publica Pp 66
- Saldaña, A, Chaves, LF, Rigg, CA, Wald C, Calzada, J 2013 Clinical Cutaneous Leishmaniasis Rates Are Associated with Household *Lutzomyia gomezi*, *Lu Panamensis*, and *Lu trapidoi* Abundance in Trinidad de Las Minas, Western Panama *Am J Trop Med Hyg*

- Salomón, O 2005 "Artrópodos de interés médico en Argentina," *Fundación Mundo Sano Serie Enfermedades Transmisibles Publicación Monográfica*, vol 6
- Salomón, OD, Acardi, SA, Liotta, DJ, Fernández, MS, Lestani, E, López, D, Mastrángelo, AV, Figueroa, M y Fattore, G 2009 "Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazu falls area of Argentina," *Acta Tropica*, vol 109, no 1, pp 5 – 11, [Online] Available <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08002167>
- Salomón, OD, Quintana, MG, Bezzi, G, Morán, ML, Betbeder, E y Valdéz, DV 2010 "*Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina," *Acta Tropica*, vol 113, no 1, pp 84 – 87 [Online] Available <http://www.sciencedirect.com/-science/article/pii/S0001706X0900254X>
- Sánchez-García, L, Berzunza-Cruz, M, Becker-Fauser, I y Rebollar-Téllez, EA 2010 Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104 (6) 406-11
- Santamaria, E, Ponce, N, Puerta, C y Ferro, C 2005 Validation of PCR as tool for the detection of *Leishmania (Viannia)* spp parasites in the *Lutzomyia* (Diptera Psychodidae) vector *Biomedica* 25 271-279
- Santamaria, E, Ponce, N, Zipa, Y, Ferro, C 2006 Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia *Biomédica* 26(Supl 1) 82-94
- Sant'Anna, M, Jones, N, Hindley, J, Mendes-Sousa, A, Dillon, R, Cavalcante, R, Alexander, B y Bates, P 2008 Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper *Acta Tropica* Volume 107, Issue 3, Pages 230–237
- Schallig, H, Da Silva, E, Van Der Meide, W, Schoone, G y Gontijo, C 2007 "*Didelphis marsupialis* (common opossum) a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil)," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol 7, no 3, pp 387–393
- Schantz, PM 2007 Visceral leishmaniasis in dogs Conference Spinone Club of America
- Shaw, JJ y Lanson, R 1987 Ecology and epidemiology New World In *The Leishmaniasis in biology and medicine Vol 1 Biology and epidemiology* (Peters W & Killick-Kendrick R eds) Academic Press Inc, London, 291-363

Sherlock, A, Galati, EB, Dedet, J, Vignes, R, Rangel, E, Ready, P, Aguiar, GM, de Medeiros, WM, Brazil, R, Brazil, B, Pimenta, P, Secundino, N, Blanco, EN, Lainson, R, Shaw, J, de Rosa, AT, de Souza, A, Cruz, A y Vilela, M 2003 *Flebotomíneos do Brasil*, E Rangel and R Lainson, Eds Editora Fiocruz

Silva, E, Gontijo, C y Melo, M 2005 "Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical leishmania species," *Trends in Parasitology*, vol 21, pp 550-552

Silva, JGD, Werneck, GL, Cruz, MDSP, Costa, CHN y De Mendonça, IL 2007 "Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* sp in Teresina, Piauí State, Brazil," *Cadernos de Saude Publica*, vol 23, no 7, 1715-1720 pp

Silva T, M. y Castellón, GE 2012 Flebotomíneos (Diptera Psychodidae) Infectados Naturalmente por *Tripanosomatídeos* (Kinetoplastida *Trypanosomatidae*) Em Fragmentos Florestais Urbanos Em Manaus - Amazonas (Brasil) *Rev Colombiana cienc Anim* 4 (1) 121-129

Speybroeck, N, Williams, C J, Lafia, K B, Devleesschauwer, B y Berkvens, D 2012 Estimating the prevalence of infections in vector populations using pools of samples *Med Vet Entomol* 26 361-371

Srinivasan, R y Panicker, KN 1992 Identification of bloodmeals of phlebotomine sandflies using the agarose gel diffusion method *Southeast Asian J Trop Med Publ Health*, 23 486-488

Steuber, S, Abdel-Rady, A y Clausen, PH 2005 PCR-RFLP analysis a promising technique for host species identification of blood meals from *tsetse* flies (Diptera *Glossinidae*) *Parasitol Res* 97(3) 247-54

Svobodová, M, Sádlová, J, Chang, K. y Volf, p 2003 "Short report distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in sanliurfa, turkey," *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol 68, no 1, 6-9 pp

Tanure, A, Peixoto, JC, Afonso, MM, Duarte, R, Pinheiro, ADC, Coelho, SVB y Barata, RA 2015 Identification of Sandflies (Diptera Psychodidae Phlebotominae) Blood Meals In An Endemic Leishmaniasis Area In Brazil *Rev Inst Med Trop S Paulo*, São Paulo , V 57, N 4, P 321-324

Telford, SR, Herrer, A, Christensen, HA 1972 Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama Ecological factors relating to the mammalian hosts *Ann Trop Med Parasitol* 1972, 66 173-179



Tesh, RB, Chanotis, BN, Aronson, MD y Johnson, KM 1971 Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test Am J Trop Med Hyg, 20 150-156

Torrez, M, Lopez, M, Le Pont, F, Martínez, E, Muñoz, M, Hervas, D et al 1998 *Lutzomyia nuñeztovari anglesi* (Diptera Psychodidae) as a probable vector of *Leishmania braziliensis* in the Yungas, Bolivia Acta Trop, 71 311-6

Travi, BL, Ferro, C, Cadena, H, Montoya-Lerma, J y Adler, GH 2002 Canine visceral leishmaniasis dog infectivity to sand flies from non-endemic areas Res Vet Sci, 72 83-6

Valderrama, A, Herrera, M y Salazar, A. 2008 Relación entre la composición de especies del genero *Lutzomyia franca* (Diptera Psychodidae, Phlebotominae) y los diferentes tipos de bosque en Panamá Acta Zoológica Mexicana Año/vol 24, numero 002 67-78 pp

Valderrama, A, Tavares, M, Dilermando, J 2011 Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera Phlebotominae Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 106(8) 1024-1031

Valderrama, A, Tavares, M y Andrade, D 2014. Phylogeography of the *Lutzomyia gomezi* (Diptera Phlebotominae) on the Panama Isthmus Parasit Vectors 7 9

Valdivia, HO, De Los Santos, MB, Fernandez, R, Baldeviano, GC, Zorrilla, VO, Vera, H, Lucas, CM, Edgel, KA, Lescano, AG, Mundal, KD y Graf, PC 2012 Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia auraensis* in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction Am J Trop Med Hyg, 87 (3) 511-7

Vasquez, AM, Paz, H, Mendez, EM, Alvar, J 1994 Leishmaniasis en Panama Ministerio de Salud de Panamá 12 p

Vásquez, A, Paz, H, Alvar, J, Perez, D, Hernandez, C 1998 Informe Final Estudios Sobre la Epidemiología de la Leishmaniasis en la parte Occidental de la República de Panamá Panamá Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud, MINSA

Vásquez Trujillo, A 2011 Variación Estacional de la Abundancia y la Infección con *Leishmania* Spp En Flebótomos De Un Area Rural De Villavicencio, Meta Tesis de Maestria Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina. Bogotá, Colombia 81 Pp

Vasquez Trujillo, A, González Reina, AE, Góngora Orjuela, A, Prieto Suárez, E, Palomares, JE y Buitrago Alvarez, LS 2013 Seasonal variation and natural infection of *Lutzomyia antunesi* (Diptera Psychodidae Phlebotominae), an endemic species in the Orinoquia region of Colombia Mem Inst Oswaldo Cruz, 108 (4) 463-9

Vélez, ID, Carrillo, LM, López, L, Rodríguez, E y Robledo, SM 2012 An Epidemic Outbreak of Canine Cutaneous Leishmaniasis in Colombia Caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis* Am J Trop Med Hyg, 86(5) 807-811

Venables, WN y Ripley, BD 2002 Modern applied statistics with S, Springer

Victoire, K, De Doncker, S, Cabrera, L, Alvarez, E, Arevalo, J, Llanos-Cuentas, A, Le Ray, D y Dujardin, JC 2003 Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis Trans R Soc Trop Med Hyg 97 80-87

Walters, LL, Chaplin, GL, Modi, GB y Tesh, RB 1989 Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera Psychodidae) a natural host-parasite association Am J Trop Med Hyg, 40 19-39

Wynsberghe, NV, Canto-Lara, S, Damián-Centeno, A, Itzá-Ortiz, M y Andrade-Narváez, F 2000 "Retention of *Leishmania mexicana* in naturally infected rodents from the state of campeche, mexico," Mem Inst Oswaldo Cruz, vol 95, pp 595-600

World Health Organization (WHO) 2010 Ed , Control of the Leishmaniasis report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 WHO technical report series, no 949

World Health Organization (WHO), 2014 <http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response-more/en/index.html> (accessed 28 01 14)

Young, DG Y Lawyer, PG 1987 New world vectors of the leishmaniasis Springer-Verlag New York

Young, DG y Duncan, MA 1994 Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera Psychodidae) Gainesville, Associated Publishers American Entomological Institute, 881p

Young, DG y Arias, JR 1992 Flebótomos vectores de leishmaniosis en las Américas OPAS, cuaderno técnico n° 33

Zeledón, R 1992 Leishmaniasis en el istmo centro-americano e islas del Caribe, In H Cosensa, A Kroeger (eds), *Enfermedades Parasitarias de Mayor Prevalencia y Transmitidas por Vectores en Centroamérica*, Programa de Cooperación Científica Internacional 135-148 p

Zhioua, E y Chelbi, I 2005 Efficacy of active underground rabbit holes around houses for reducing the indoor density of sandflies Arch Inst Pasteur Tunis 82 76 ISOPS

Zimmerman, JH, Newson, HD, Hooper, GR y Christensen, HA 1977 A comparison of egg surface structure of six anthropophilic phlebotomine sand flies (*Lutzomyia*) with the scanning electron microscope (Diptera Psychodidae) *J Med Entomol* 13 574-579

# ANEXOS

## ESTATUS DE LA ENDEMICIDAD DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN EL MUNDO

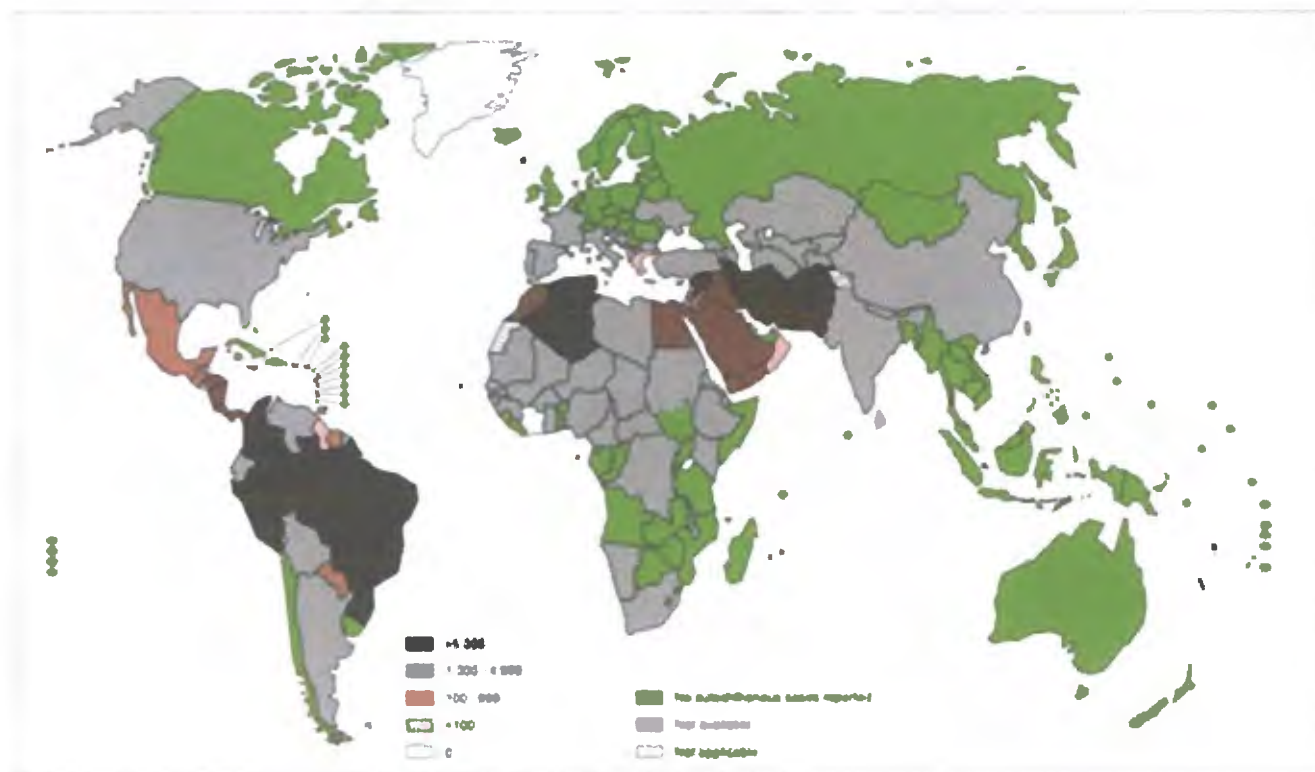


Fig. 18. Distribución Global de la Leishmaniasis cutánea en el 2012 (Fuente: WHO-NTD, 2013).

### CARACTERISTICAS DE LA COMUNIDAD TRINIDAD DE LAS MINAS, CAPIRA.



Fig. 19: Actividades realizadas en la comunidad de Trinidad de las minas durante el estudio, charlas de docencia a los estudiantes y padres de familia sobre la prevención de la leishmaniasis y sus vectores, colocación de trampas de luz para las colectas de las chitras.

## EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO PARA EL ANALISIS DE LAS CHITRAS

- PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ADN



Fig. 20: Proceso de extracción de ADN se realizó en una Cabina de Bioseguridad, utilizando los siguientes insumos y equipos: Vortex, Tubos Eppendorf, Puntas con filtro, Micropipetas, Microcentrifuga, kit de extracción de QiaGen, Baño maría, Biofotómetro (medir la concentración de ADN final obtenido), Congelador (para almacenar el ADN).



- **PROCESO DE PREPARACION DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR**

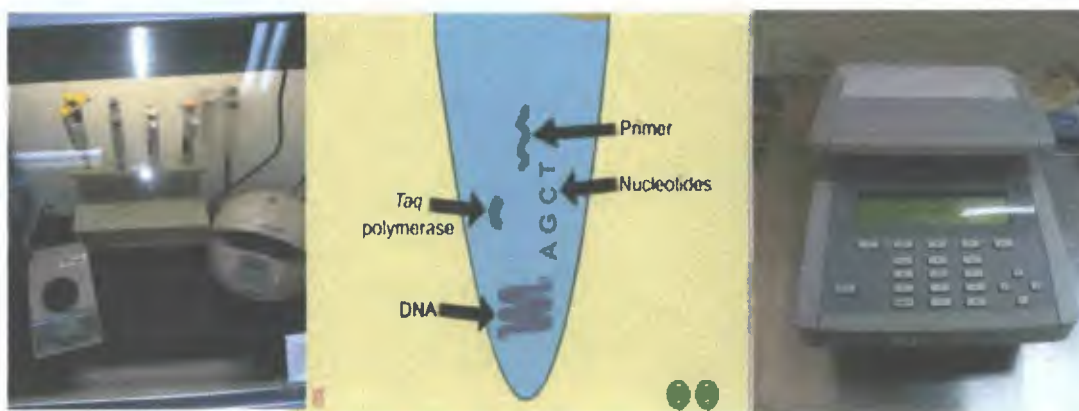


Fig. 21: La preparación de la mezcla de reacción para el PCR, se realizó en la Cabina de Bioseguridad de PCR y se llevó a cabo en un Termociclador marca Applied Biosystem.

- **PROCESO DE ELECTROFORESIS**



Fig. 22: Proceso de electroforesis se realizó con la preparación de gel de agarosa al 1.5 % en Buffer TBE 0.5X, corrida electroforética a 85 Voltios por una hora.



## ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE MAXIMUM LIKELIHOOD

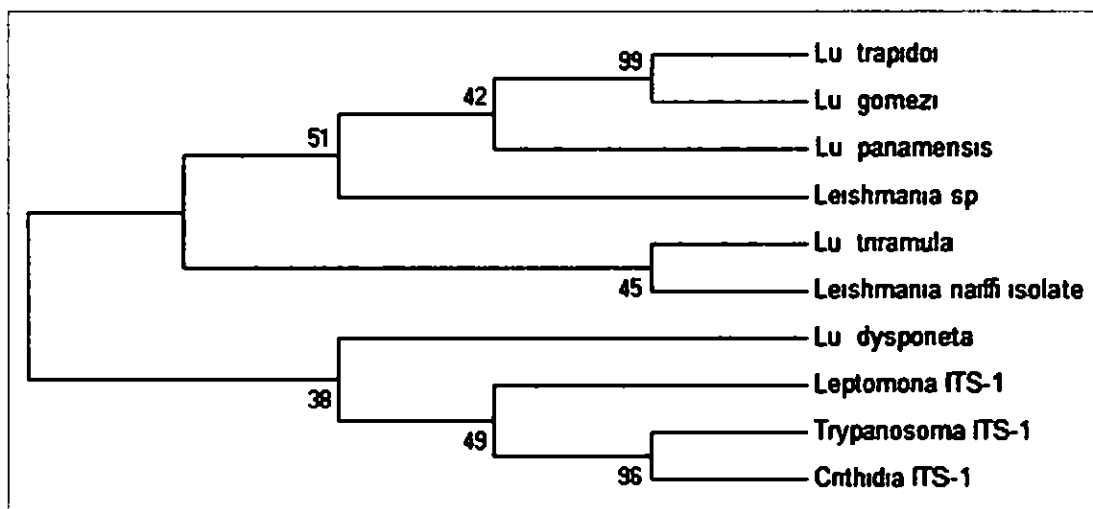


Figure 23 Analisis filogenético realizado por el método de Maximum Likelihood para inferir en la relación filogenética de nuestras muestras. Este método se basó en el Modelo Kimura-2 parámetros, soportado por un Bootstraps de 500 repeticiones, infiriendo que la infección positiva del PCR ITS-1 de los pool de *Lu gomezi*, *Lu trapidoi* y *Lu panamensis* están muy relacionados con la especie *Leishmania sp*. Y posiblemente la infección mostrada por *Lu trramula*, esté relacionada a algún tipo de *Leishmania*. En contraste con la infección encontrada en *Lu dysponeta* que puede ser de otro tipo de Trypanosomatides como (*Leptomona*, *Trypanosoma*, *Crithidia*). El análisis fue realizado por MEGA 6.

## PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR ITS-1

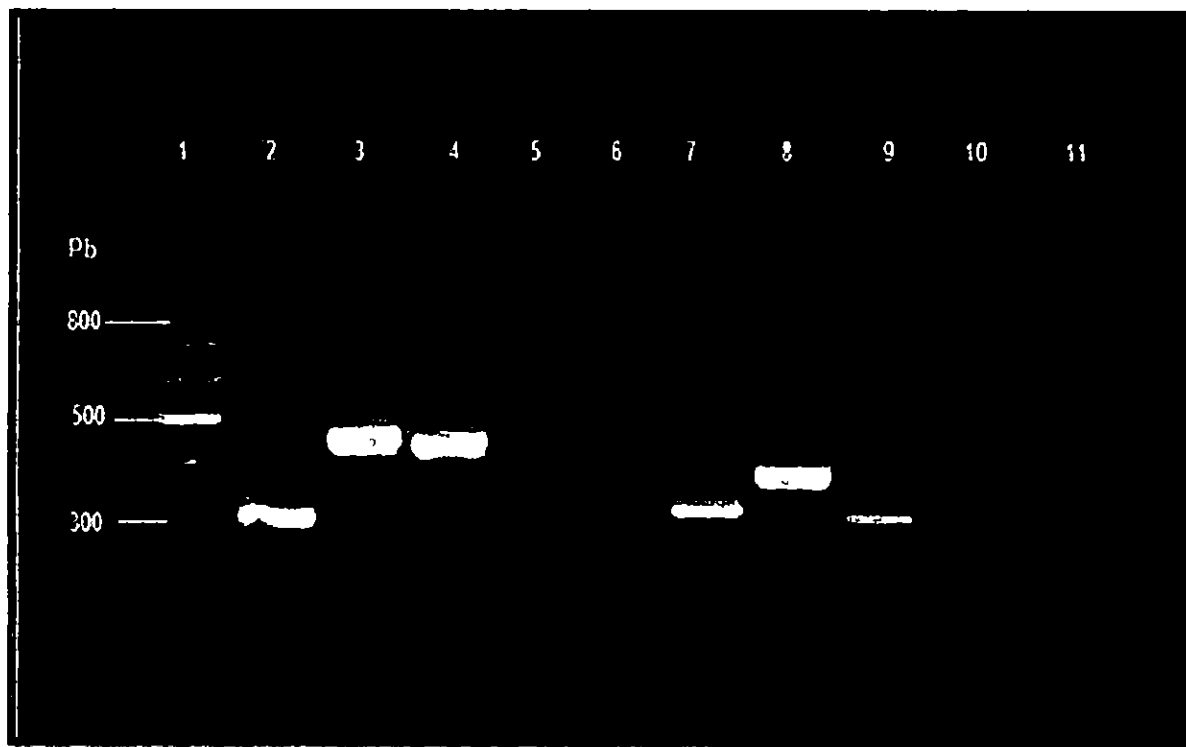


Fig 24 Electroforesis de productos amplificados por PCR ITS-1, para detectar infección por *Leishmania* spp. carril 1 marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 2 Control positivo de *Le panamensis*, carril 3, 4, 7 y 8 pool de *Lu gomezi*, carril 9 pool de *Lu panamensis*, carril 11 Control negativo

## PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR ITS-1

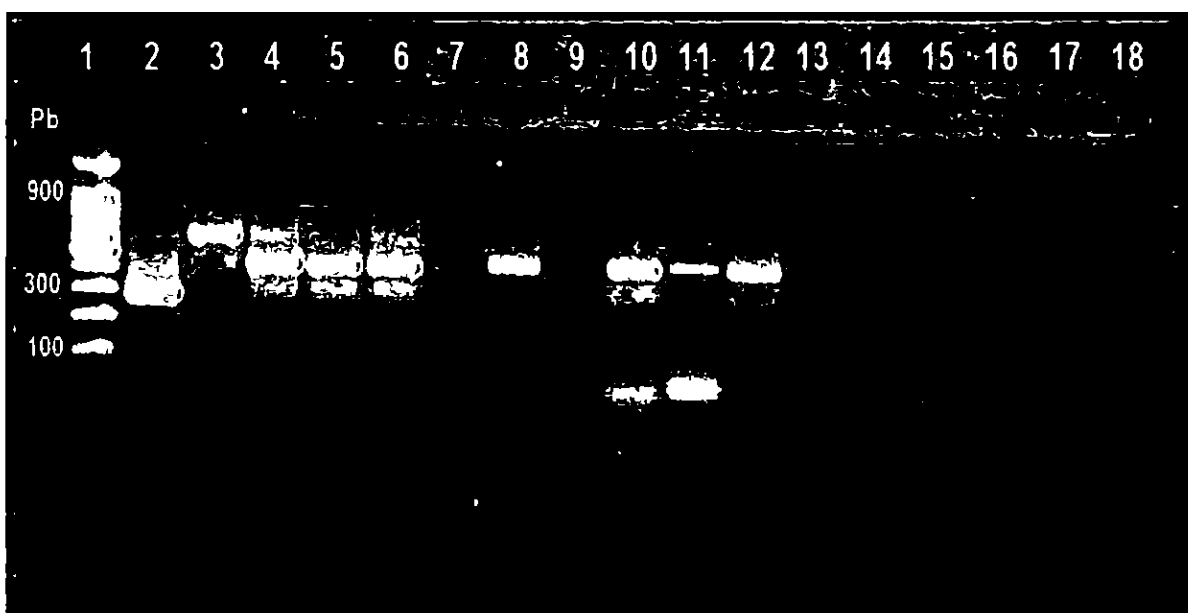


Fig 25 Electroforesis de productos amplificados por PCR ITS-1, para detectar infección por *Leishmania* spp. carril 1 marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 2 Control positivo de *Le panamensis*, carril 3-6 pool de *Lu trapidoi*, carril 8 pool de *Lu gomezi*, carril 10-11 pool de *Lu. trapidoi*, carril 12 pool de *Lu panamensis*, carril 15 control negativo

## PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR MULTIPLEX

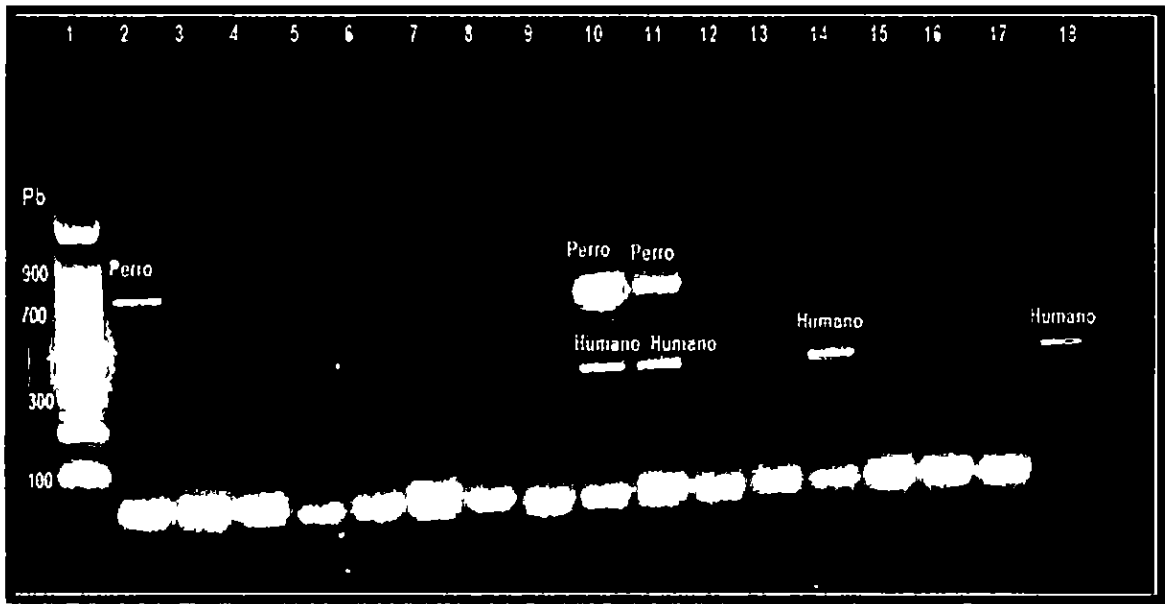


Fig. 26 Electroforesis de productos amplificados por el PCR Multiplex para detectar la ingesta sanguínea de los pool de chitras carril 1 marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 2 pool de *Lu panamensis*, carril 10 pool de *Lu gomezi*, carril 11, 14 y 18 pool de *Lu trapidoi*

## PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR MULTIPLEX

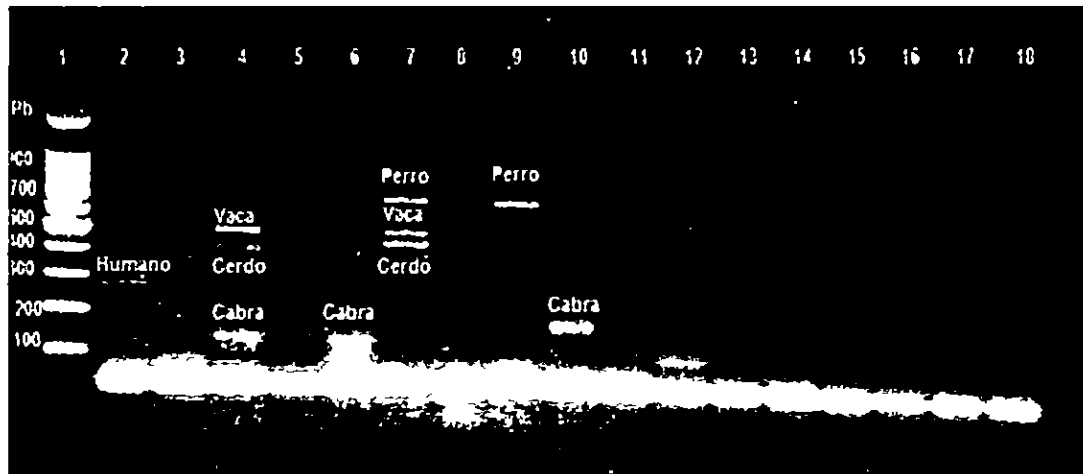


Fig 27 Electroforesis de productos amplificados por el PCR Multiplex para detectar la ingesta sanguinea de los pool de chitras: carril 1 marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 2 pool de *Lu gomezi*, carril 4 y 6 pool de *Lu trramula*, carril 7 pool de *Lu gomezi*, carril 9 pool de *Lu panamensis*, carril 10 pool de *Lu dysponeta*, carril 18 control negativo

## PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR PARA AVES EN GENERAL

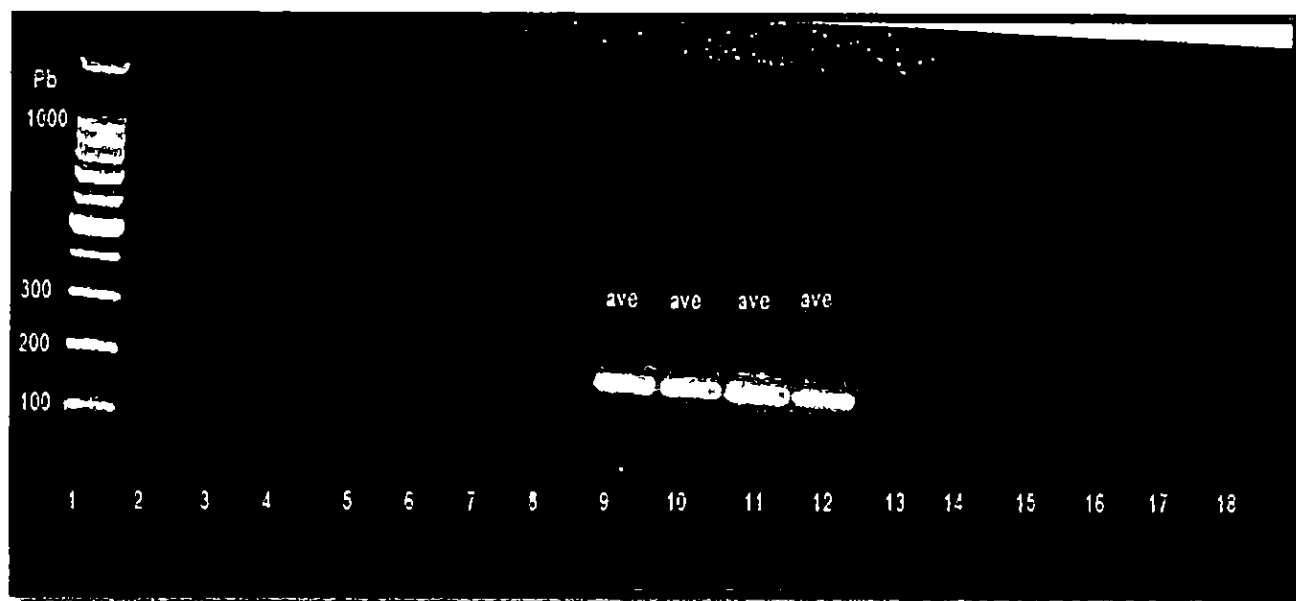


Fig 28 Electroforesis de productos amplificados por el PCR para aves en general carril 1 marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 9-12 pool de *Lu gomezi*

## PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR PARA AVES EN GENERAL

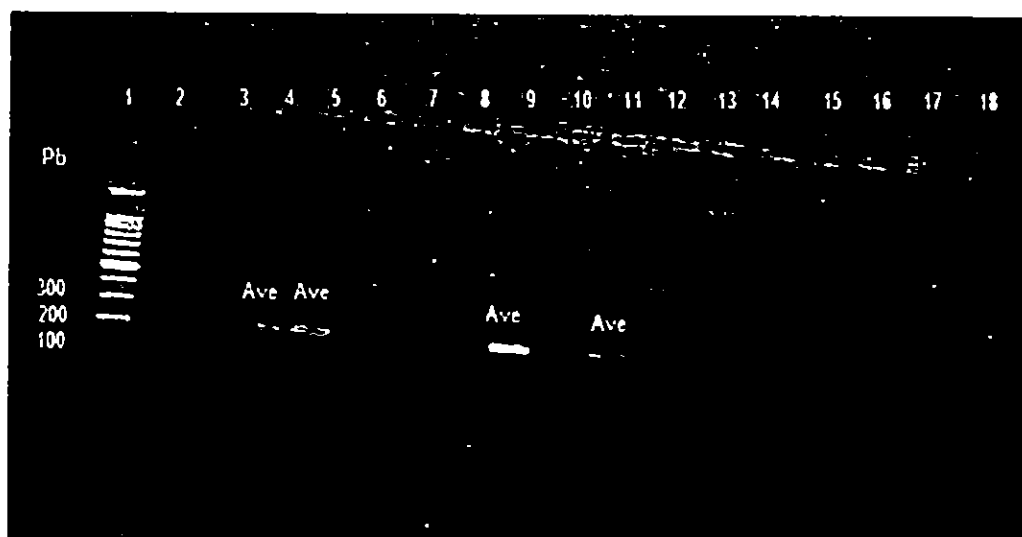


Fig 29 Electroforesis de productos amplificados por el PCR para aves en general carril 1 marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carril 4-5 pool de *Lu trapidoi*, carril 9 y 11 pool de *Lu gomezi*